รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด-2562

---

1. **แผนงานวิจัย** : วิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุลเพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร

2. **โครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุลเพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร

   กิจกรรม : การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติในประเทศเพื่อการป้องกันกำจัดและการส่งออก

   กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : -

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การผลิตแอนติบอดีของเชื้อไวรัส *Watermelon silver mottle virus* ในระบบเซลล์แบคทีเรีย

4. **ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ)** : Antibody Production for *Watermelon silver mottle virus* in the Bacterial cell system

   คณะผู้ดำเนินงาน

   หัวหน้าการทดลอง : กาญจนา วาระวิชะนี สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

   ผู้ร่วมงาน : แสนชัย คำหล้า สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. **บทคัดย่อ**

การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส Watermelon silver mottle virus โดยใช้โปรตีนลูกผสมส่วน coat protein ที่ผลิตในระบบเซลล์แบคทีเรีย ค่าความเจือจางของแอนติซีรั่มสูงสุดที่ 16,384 เท่า พบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส WSMoV ตรวจพบเชื้อไวรัสได้ในส่วนของ ยอด ใบ กิ่งก้านและผิวผลของแตงโมด้วยเทคนิค indirect ELISA แต่พบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีเกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กับตัวอย่างแตงโมปกติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดตรวจแบบ DAS-ELISA Kit ทางการค้าที่มีจำหน่าย

คำสำคัญ : แตงโม, ทอสโพไวรัส, โพลีโคนอลแอนติบอดี

ABSTRACT

Production of Polyclonal Antibody prepared against coat protein gene of Watermelon silver mottle virus acquired from bacteria system. The titer of polyclonal antibody is 16,384 times. Infected watermelon samples from various parts; shoots, leaves, vines tendrils and fruit rind showed positive against polyclonal antibody using indirect ELISA technique. However, polyclonal antibody has also cross reaction against healthy watermelon comparison to antibody purchased from commercial product.

Key words : Tospovirus , polyclonal antibody, Watermelon Silver mottle virus (WSMoV), recombinant protein, indirect-ELISA

6. คำนำ

ทอสโพไวรัส (Tospovirus) เชื้อสาเหตุโรคพืชสำคัญชนิดหนึ่งสามารถสร้างความเสียหายแก่พืชเศรษฐกิจสำคัญหลายชนิดทั่วโลก มีพืชอาศัยกว้างมากกว่า 600 ชนิด ทั้งไม้ผล ไม้ประดับและพืชผัก (Peters and Goldbach, 1995) จัดอยู่ใน Family Bunyaviridae และ Genus Tospovirus อนุภาคไวรัสมีลักษณะทรงกลม (spherical) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 80-120 นาโนเมตร กรดนิวคลีอิกเป็นอาร์เอ็นเอ (RNA) สายเดี่ยว จำนวน 3 โมเลกุล คือ L-RNA ขนาด 8.9 กิโลเบส M-RNA ขนาด 4.8 กิโลเบส และ S-RNA ขนาด 2.9 กิโลเบส กรดนิวคลีอิกแต่ละโมเลกุลห่อหุ้มด้วยโปรตีน (nucleocapsid protein) และมีเยื่อหุ้ม (envelope) ประกอบด้วยไขมันและไกลโคโปรตีน 2 ชนิด มีเพลี้ยไฟเป็นแมลงพาหะในการถ่ายทอดโรคความสัมพันธ์แบบคงทน (persistent) เชื้อไวรัสสามารถเพิ่มปริมาณได้ทั้งในพืชและแมลงพาหะ (Chen et al., 1990; Cortes et al.,1998) ลักษณะอาการของโรคที่พบแตกต่างกันไปตามชนิดเชื้อไวรัส ชนิดพืชอาศัย และสภาพแวดล้อม (German et al., 1992) พบรายงานการเกิดโรคในกลุ่มประเทศแถบเอเชีย ได้แก่ ไต้หวัน ญี่ปุ่น และจีน ประสบปัญหาการระบาดโรคจากทอสโพไวรัส (Tospovirus) กับพืชตระกูลแตง สาเหตุหลักเกิดจากไวรัส Watermelon silver mottle virus (WSMoV) เป็นทอสโพไวรัส ใน serogroup IV สร้างความเสียหายอย่างมากกับผลผลิตเมลอน (Yeh et al., 1992 ; Okuda et al., 2002; Rao X. et al., 2011) สำหรับประเทศไทยเชื้อไวรัส WSMoV ระบาดและสร้างความเสียหายกับผลผลิตเมลอนและแตงโมในพื้นที่ปลูกหลายจังหวัด เช่น ขอนแก่น สกลนคร มหาสารคาม กาฬสินธุ์ กาญจนบุรี ราชบุรี ตาก เชียงใหม่ เชียงราย และลำพูน เป็นต้น (วิมล และคณะ, 2547; ศลิษฎ์ และอรอุมา, 2562) แปลงปลูกพืชตระกูลแตง

ที่มีการระบาดเชื้อไวรัส WSMoV ส่วนใหญ่พบเพลี้ยไฟชนิด Thrips tabaci เป็นแมลงพาหะ (พิสสรรณ และคณะ, 2549) ลักษณะอาการที่พบ ใบเป็นแผลเนื้อเยื่อตาย เถาแตงแสดงอาการเนื้อเยื่อตายสีน้ำตาลไหม้ลามจากส่วนยอดลงมา ผลเป็นแผลสะเก็ดสีดำเงาลักษณะแผลรูปร่างไม่แน่นอน ผลมีขนาดเล็กทำให้เมล็ดพันธุ์ที่ผลิตได้ไม่มีคุณภาพ (วิมล และคณะ, 2547; วิมล, 2548 ; Pongsapich and Chiemsombat, 2002 ; Rao X. et al., 2011) สร้างปัญหาให้เกษตรกรและบริษัทผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์เป็นอย่างมาก ทั้งนี้ทอสโพไวรัสเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชกักกันการตรวจรับรองเพื่อการส่งออกไปยังต่างประเทศ เช่น Le (1970) เคยรายงานไว้ว่า Tomato spotted wilt virus (TSWV) สามารถถ่ายทอดผ่านเมล็ดไม้ดอกซิเนอราเรีย cineraria ได้สูงถึง 96 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น หากมีปัญหาเรื่องการปนเปื้อนได้ในเมล็ดพันธุ์ส่งออกอาจจะส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจในภาพรวมของประเทศ

สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อทอสโพไวรัสที่นิยมและมีความหน้าเชื่อถือ คือ การตรวจสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโดยตรง เช่น วิมล และคณะ (2548) ทำการตรวจวินิจฉัยทอสโพไวรัสด้วยเทคนิค multiplex RT-PCR จากตัวอย่างแตงโมจากส่วนพบดีเอ็นเอขนาด nucleocapsid gene (N เชื้อไวรัส WSMoV ขนาด 828 คู่เบส และเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาโดยการใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อไวรัส เช่น เทคนิค ELISA ซึ่งมีข้อได้เปรียบ คือ วิธีการและเครื่องมือไม่ซับซ้อนน้อยกว่าการตรวจสารพันธุกรรม ตรวจสอบตัวอย่างได้มากต่อครั้งและมีความแม่นยำ อรประไพ และคณะ (2556) ได้ทำการผลิตโพลโคลนอลและโมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถตรวจทอสโพไวรัส ใน serogroup IV ได้หลายชนิด ดังนั้น งานวิจัยนี้ต้องการพัฒนาแอนติบอดีที่สามารถตรวจเชื้อไวรัส WSMoV ได้จำเพาะขึ้นเพื่อประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส WSMoV ด้วยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาที่มีการระบาดอยู่ในแหล่งปลูกแตงโมของประเทศไทยสามารถประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านการปรับปรุงพันธุ์ที่ให้ทนทานต่อเชื้อไวรัสและการตรวจติดตามหากเชื้อไวรัสมีการกลายพันธุ์ในอนาคต ตรวจเมล็ดพันธุ์นำเข้าหรือส่งออกสำหรับใช้ทำพันธุ์เพื่อให้มั่นใจว่าปราศจากเชื้อไวรัส WSMoV ที่อาจปนเปื้อนได้ รวมทั้ง การผลิตแอนติบอดีได้เองสามารถลดข้อจำกัดเรื่องต้นทุนต่อหน่วยที่ค่อนข้างสูงมากเมื่อซื้อจากบริษัทการค้าเพื่อใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุและแอนติบอดีที่ได้ยังเป็น

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรค และตัวอย่างพืชปกติ

2. อุปกรณ์ห้องปฏิบัติการ ได้แก่

- เครื่องชั่งละเอียด (precision balance) 2 และ 4 ตำแหน่ง
- ตู้แช่แข็ง -20, -40 องศาเซลเซียส (freezer)
- ตู้ดูดควัน / ตู้ดูดไอสารเคมี (Fume Hood)
- อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (water bath shaker)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (C1000TM Thermal Cycler, BIO-RAD)
- เครื่องเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel electrophoresis)
- เครื่องวิเคราะห์เจลและบันทึกภาพ (ChemiDoc™ Touch Imaging System, BIO-RAD)
- เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer)

3. อุปกรณ์ด้านวิทยาศาสตร์ ได้แก่

- หลอดไมโครทิวป์ (Microtube) ขนาด 0.5, 1.5 และ 2 มิลลิลิตร
- ไมโครปิเปตต์ทิป (Micropipette tip) ขนาด 10, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
- เพลทแบบ 96 หลุม (96-microwell plate)

4. สารเคมีวิทยาศาสตร์ ได้แก่

- ชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป FavorPreptm Total RNA Mini kit (FAVOGEN)
- ชุดสกัดเจลและพีซีอาร์สำเร็จรูป FavorPreP GEL/PCR Purification Mini Kit (FAVORGEN)
- SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNAPolymerase
- ดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler 100 bp, 1 kb DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific)
- โปรตีนมาตรฐาน BLUtra Prestained Protein Ladder (BIO-HELIX)
- Agarose gel (SeaKem®)
- Novex® 4-20% Tris-Glycine Mini Gels, 1.0 mm, 10 well (Invitrogen)
- สารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin, laboratory grade)
- ชุดไพรเมอร์ (Primer set)
- พลาสมิดพาหะ pGEM-T easy vector (Promega)
- พลาสมิดพาหะ pBAD/His A, B, and C vector (Invitrogen)
- competent cell (E. coli สายพันธุ์ Top 10) (Invitrogen)
- ProBond™ Nickel-Chelating Purification System (Invitrogen)
- แอนติบอดีต่อเชื้อ WSMoV (ELISA Reagent Set for WSMoV, Agdia)

- **วิธีการ**

1. การเก็บตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างแตงโมจากแปลงปลูกเกษตรกร จ. ขอนแก่น ที่แสดงลักษณะอาการโรคคล้ายทอสโพไวรัสเข้าทำลายจากเชื้อไวรัส WSMoV โดยเก็บส่วนต่าง ๆ ของพืช ใส่ถุงพลาสติกที่ถูกหุ้มด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์พร้อมเขียนหมายเลยตัวอย่าง วันที่ สถานที่เก็บ จากนั้นจึงนำตัวอย่างเก็บไว้ในกระติกน้ำแข็งตลอดเวลา เพื่อนำมาตรวจวินิจฉัยที่ห้องปฏิบัติการ ต่อไป

2. การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป

สกัดอาร์เอ็นเอจากส่วนต่างๆ ของแตงโมงที่เก็บจากแปลงปลูกเกษตรกร จ. ขอนแก่น ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป FavorPreptm Total RNA Mini kit (FAVOGEN) ดังนี้ ชั่งน้ำหนักตัวอย่างพืชแต่ละส่วนที่ต้องการทดสอบประมาณ 0.1 กรัม ใส่ในโกร่งแล้วเติมไนโตรเจนเหลว บดให้เป็นผงละเอียด เติม FARB buffer ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เติม 2B-mercaptoethanol ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บดตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วย้ายสารละลายใส่หลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเศษพืชที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นเทสารละลายลงใน Filter Column (สีขาว) ที่บรรจุอยู่ใน Collection tube แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บสารละลายส่วนใสมาเติม 70 % ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ ด้วยไมโครปิเปตต์ทิป หลังจากนั้นเทสารละลายส่วนใสลงใน FARB Mini Column (สีแดง) ที่บรรจุอยู่ใน Collection tube ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วย้าย FARB Mini Column (สีแดง) ใส่ในหลอด Collection tube อันใหม่ เติม Wash Buffer 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วย้าย FARB Mini Column (สีแดง) ใส่ในหลอด Collection tube อันใหม่ เติม Wash Buffer 2 ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที (ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง) แล้วย้าย FARB Mini Column (สีแดง) ใส่ในหลอด Collection tube อันใหม่ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที หลังจากนั้นย้าย FARB Mini Column (สีแดง) ใส่ในหลอดไมโครทิวป์ ขนาด 1.5 ไมโครลิตร แล้วเติม Elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ได้สารละลายอาร์เอ็นเอและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ ที่ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR ต่อไป

3. การสังเคราะห์ Nucleocapsid gene (N gene) เชื้อไวรัส WSMoV ด้วยเทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

สังเคราะห์ N gene ของเชื้อไวรัส WSMoV ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบให้ครอบคลุม Nucleocapsid gene (N gene/CP gene) จำนวน 1 คู่ คือ ไพรเมอร์ WSMoV-N-F3 (10 pmol) (5'ATG TCT AAC GTT AAG CAG CTT 3') และไพรเมอร์ WSMoV-N-R3 (10 pmol) (5' TTA CAC TTC CAA GGA AGT GCT 3') เพื่อใช้ประกอบปฏิกิริยา One step RT-PCR (Invitrogen) ดังนี้ น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ (dH_2O) จำนวน 18 ไมโครลิตร, 2x buffer จำนวน 25 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ (25 mM) จำนวน 1 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ WSMoV-N-F3 (10 pmol) จำนวน 1 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ WSMoV-N-R3 (10 pmol) จำนวน 1 ไมโครลิตร, เอนไซม์ SuperScript™ III /platinum Taqmix จำนวน 2 ไมโครลิตร (,0.1 unit/µl) และอาร์เอ็นเอต้นแบบจำนวน 2 ไมโครลิตร ปริมาตรรวมทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ทำการสังเคราะห์ WSMoV-CP gene ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (C1000™ Thermal Cycler, BIO-RAD) ตั้งรอบปฏิกิริยา ดังนนี้ ขั้นที่ 1: cDNA synthesis ที่ 48°C นาน 30 นาที ขั้นที่ 2: Pre-denature 94°C นาน 1 นาที ขั้นที่ 3 : denature 94°C นาน 15 วินาที ขั้นที่ 4 : annealing 60°C นาน 30 วินาที ขั้นที่ 5: Extension 68°C นาน 1 นาที (วนซ้ำขั้นที่ 3 – 5 จำนวน 30 รอบ) Post-extension 68°C นาน 10 นาที และ Hold ที่ 15°C และตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตราฐาน 100 bp DNA Ladder ทำการวิเคราะห์และบันทึกภาพด้วยเครื่อง ChemiDoc™ Touch Imaging System, BIO-RAD

4. เพิ่มบริเวณจดจำของ restriction enzyme site กับไพรเมอร์

เลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ที่เหมาะสมนำมาออกแบบตำแหน่งจดจำบริเวณ 5' และบริเวณ 3' ของคู่ไพรเมอร์ WSMoV-N-F3 /WSMoV-N-R3 และเพิ่มตำแหน่ง stop codon (TAA) บริเวณ 3' เพื่อใช้ประกอบปฏิกิริยาการสังเคราะห์ WSMoV-CP adapter ด้วยเทคนิค PCR ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (C1000™ Thermal Cycler, BIO-RAD)

5. ตัดดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะและโคลนยีนเข้า Expression vector

นำชิ้นยีน WSMoV-CP adapter และพลาสมิดพาหะ pBad/HisA Expression vector ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PstI* และ *EcoRI* แบบ Double digestion ตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์ (FastDigest® enzyme, Fermentas, Canada) และโคลนยีน digested WSMoV-CP adapter โดยเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ digested pBad/HisA Expression vector (Invitrogen) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่

คอมพีเทนซ์ *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 ด้วยวิธีการ heat shock transformation (Sambrook and Russell, 2001) ทำการเลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่มีพลาสมิดสายผสมด้วยเทคนิค blue white colony และตรวจสอบยืนเป้าหมายด้วยเทคนิค colony PCR

6. เตรียม starter gene ทดสอบกระตุ้นแสดงออกของโปรตีนลูกผสมและวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธี SDS-PAGE

การเตรียม starter gene โดยนำโคลนเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 จำนวน 1 โคโลนี ที่ตรวจสอบแล้วว่ามีพลาสมิดสายผสมของชิ้นยีน WSMoV-CP adapte/6xHisTag ใน pBAD/His A expression vector (WSMoV-CP recombinant protein) เลี้ยงในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 10 ไมโครลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำสารละลาย starter gene ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 50 ไมโครลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารละลาย 20% L-Arabinose ความเข้มข้นแตกต่างกันอย่างน้อย 5 ระดับ เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีนลูกผสม และหาช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโปรตีนลูกผสม หลังจากนั้นวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ด้วย TGX Stain-Free FastCast Acrylamine Kit, 12 % (BIO-RAD, Cat#1610185) ด้วยเครื่อง Mini-PROTEAN® Tetra Cell (BIO-RAD, Cat#1658005) ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 120 เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นย้อมแถบโปรตีนด้วยสารละลาย Coomassie Brilliant Blue เขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง ล้างสีย้อมส่วนเกินออกด้วยสารละลาย Destaining เขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง เปรียบเทียบขนาดโปรตีนลูกผสมกับแถบโปรตีนมาตรฐาน BLUtra Prestained Protein Ladder (BIO-HELIX, Cat#1BHC-PM001-0500) ตรวจสอบแถบโปรตีนและบันทึกภาพด้วยเครื่องวิเคราะห์เจล (ChemiDoc™ Touch Imaging System, BIO-RAD)

7. การแยกสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์

เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 ที่มีพลาสมิดสายผสม WSMoV-CP-adapter gene/6xHisTag (WSMoV-CP recombinant protein) เพื่อนำมาใช้เป็น starter gene ตามวิธีการข้อ 6 จากนั้นนำสารละลาย starter gene ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร

500 มิลลิลิตร ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 500 ไมโครลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเหนี่ยวนำการสังเคราะห์โปรตีนด้วยสารละลาย 20% L-Arabinose ตามความเข้มข้นที่เลือกให้เหมาะสม เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตามช่วงเวลาที่เลือกให้เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนมากที่สุด ทำการตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บตะกอนมาละลายด้วย lysis buffer A นำไป sonicate ด้วยเครื่อง ultra schall BANDELIN SONOPULS HD และแยกสกัดโปรตีน WSMoV-CP recombinant protein ให้บริสุทธิ์ด้วย ProBond™ Nickel-Chelating Purification System ตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์ (Novex, Catalog Numbers R801-01) ทำการวิเคราะห์ปริมาณและความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

8. ผลิตแอนติบอดีในสัตว์ทดลอง

การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส WSMoV-CP ในสัตว์ทดลอง โดยเตรียมแอนติเจนโปรตีนลูกผสมของ WSMoV-CP recombinant protein ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับ complete Freund's adjuvant (CFA) ในอัตราส่วน 1:1 ให้ผสมเข้ากันเป็น emulsion ใช้ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (immunized intramuscular) ของกระต่าย (New Zealand White rabbit) ในครั้งแรก สำหรับการฉีดครั้งต่อไปผสมแอนติเจนกับ Incomplete Freund's adjuvant (IFA) ในอัตราส่วนและปริมาตรเท่าเดิม ใช้ฉีดสัตว์ทดลองทุก ๆ 2 สัปดาห์ รวมอีก 3 ครั้ง หลังจากฉีดสัตว์ทดลองครั้งที่ 2 ทำการเก็บเลือดโดยเจาะเส้นเลือดบริเวณใบหู และดำเนินการเก็บเลือดต่อเนื่องทุก ๆ 1 สัปดาห์อีก 5 ครั้ง

9. ทดสอบประสิทธิภาพโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตด้วยเทคนิค ELISA

บดตัวอย่างพืชเป็นโรคใน carbonate coating buffer, pH 9.6 หยดลงในหลุมของโครเพลท (96-microwell plate) 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ล้างไมโครเพลทด้วย phosphate buffer saline ที่มี tween 20 ผสมอยู่ (1X PBST) 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที เจือจางโพลีโคลนอลแอนติบอดีเชื้อไวรัส WSMoV ที่ผลิตได้ใน conjugate buffer 1: 500 และ 1 : 1,000 หยดลงในหลุมของไมโครเวลเพลท 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างไมโครเพลทด้วย 1X PBST จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วเคาะ plate ให้แห้ง เพื่อเติม Goat anti-rabbit IgG with alkaline phosphatase (AP3074, formerly Roche 1814206) ที่เจือจางใน PBS 1 : 3,000 หยดลงในหลุมของไมโครเพลท 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างไมโครเพลทด้วย 1X PBST จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วเคาะ plate ให้แห้ง จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

ล้างด้วย 1X PBST จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที เตรียม 1x PNP substrate solution เติมลงในไมโครเพลท ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30-60 นาที ตรวจสอบผลของปฏิกิริยาโดยอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm ด้วยเครื่อง Microplate Readers (Multiskan™ GO, ThermoFisher Scientific, USA)

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2559-กันยายน 2562

สถานที่ กลุ่มงานไวรัสวิทยาและโรงเรือนทดลอง
ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการเก็บตัวอย่างพืช

ตัวอย่างแตงโมจากแปลงปลูกเกษตรกร จ. ขอนแก่น โดยเก็บส่วนต่าง ๆ ของพืชที่แสดงอาการจุดเนื้อเยื่อฉ่ำน้ำและไหม้ตายเป็นสีน้ำตาลสีดำบริเวณยอด ใบ กิ่งก้าน และขั้วผล **(ภาพที่ 1A-C)** ผิวผลระยะเริ่มแรกแสดงอาการเนื้อเยื่อฉ่ำน้ำเป็นจุดนูนใส ผิวผลสีไม่สม่ำเสมอลักษณะด่างเหลือง ต่อมาจุดเนื้อเยื่อเป็นแผลไหม้ดำลึกเข้าเนื้อผลขยายติดกันจนเป็นแผลขนาดใหญ่ และแห้งเป็นสะเก็ดสีน้ำตาลเข้มหรือสีขาวกระจายทั่วผล **(ภาพที่ 2A-D)** ซึ่งลักษณะอาการโรคที่พบจากแปลงปลูกเกษตรกร จ. ขอนแก่น คล้ายกับอาการโรคจากเชื้อไวรัส WSMoV เข้าทำลาย (กาญจนา และคณะ, 2558) จึงนำมาตรวจยืนยันเชื้อสาเหตุในห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิค RT-PCR ก่อนใช้ทดลองต่อไป

2. ผลการสังเคราะห์ Nucleocapsid gene (N gene) เชื้อไวรัส WSMoV ด้วยเทคนิค RT-PCR

นำตัวอย่างแตงโมส่วน ยอด ใบ กิ่งก้าน ขั้วผล และผิวผล ที่เก็บจากแปลงปลูกเกษตรกร จ. ขอนแก่น มาสกัดชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป FavorPreptm Total RNA Mini kit (FAVOGEN) ได้สารละลายอาร์เอ็นเอมาสังเคราะห์ Nucleocapsid gene (N gene) เชื้อไวรัส WSMoV ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยคู่ไพรเมอร์ WSMoV-N-F3/ WSMoV-N-R3 เมื่อตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรฟอรีซิส พบว่า ทุกส่วนของพืชที่ใช้ทดสอบสามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาดที่ประมาณ 800 bp ซึ่งเป็นส่วนของ Nucleocapsid gene (N gene/CP gene) ของเชื้อไวรัส WSMoV เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตราฐาน 100 bp DNA Ladder **(ภาพที่ 3)** ดังนั้น คู่ไพร์เมอร์ WSMoV-N-F3/ WSMoV-N-R3 ที่ออกแบบสำหรับการทดลองครั้งนี้สามารถสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน N gene ของเชื้อไวรัส WSMoV ได้

3. ผลการเพิ่มบริเวณจดจำของ restriction enzyme site กับไพรเมอร์

ไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ที่บริเวณ 5’ และบริเวณ 3’ ได้แก่ *PstI* (5´-CTGCA↓G-3´ 3´-G↑ACGTC-5´) และ *EcoRI* (5´-G↓AATTC-3´ 3´-CTTAA↑G-5´) ตามลำดับ และเพิ่มตำแหน่ง stop codon (TAA) บริเวณ 3’ จำนวน 1 คู่ **(ตารางที่ 1)** สำหรับใช้เป็นส่วนประกอบปฏิกิริยาการสังเคราะห์ WSMoV-CP gene adapter ด้วยเทคนิค PCR ทำการตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสพบแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1,100 bp เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตราฐาน 100 bp DNA Ladder

4. ผลตัดดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและโคลนยีนเข้า Expression vector

ตัดชิ้นยีน WSMoV-CP adapter และพลาสมิดพาหะ pBad/HisA Expression vector ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ PstI และ EcoRI แบบ Double digestion ทำการเชื่อมต่อด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase โคลนยีนเข้าแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 คัดเลือกด้วยเทคนิค colony PCR โดยคู่ไพร์เมอร์ pBAD-F/pBAD-R พบว่า โคโลนีแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดสายผสมของชิ้น WSMoV-CP gene/6xHisTag จะแสดงแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ ~ 950 เบส เมื่อเทียบกับโคโลนีแบคทีเรียปกติที่ได้รับเฉพาะพลาสมิด Expression vector จะแสดงแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 300 เบส **(ภาพที่ 4)** ซึ่งเป็นขนาดของลำดับเบสบางส่วนของ pBAD/His A expression vector เมื่อส่งวิเคราะห์หาลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่ FIRST BASE LABORATORIES SDN BHD ประเทศมาเลเซีย พบว่า WSMoV-CP gene/6xHisTag มีจำนวน 954 นิวคลีโอไทด์ และพบลำดับเบสทั้ง start codon (ATG) และ stop codon (TAA) เมื่อตรวจตำแหน่ง frame shift ของการแปลรหัสลำดับแอมิโนพบการจัดเรียง กรดแอมิโนได้ถูกต้องจำนวน 318 เรซิดิวส์ และพบตำแหน่งแอมิโนของ HHHHHH-Polyhistidine Region (6xHisTag) เพื่อประโยชน์สำหรับการเตรียมโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยระบบ ProBond™ Nickel-Chelating Purification System (Invitrogen, USA.)

5. ผลการแยกสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์

เลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 ที่มีพลาสมิดสายผสม WSMoV-CP gene/6xHisTag/pBAD-HisA expression vector (fusion protein) เหนี่ยวนำโปรตีนลูกผสมให้แสดงออกด้วยสารละลาย 20% L-(+)-Arabinose จำนวน 2 เท่า ในสารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ทดสอบการสกัดโปรตีนด้วยวิธี Native condition และ denature condition และวิเคราะห์การแสดงออกโปรตีนลูกผสมด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่า การสกัดโปรตีนลูกผสมแบบ denature condition ได้ผลผลิตโปรตีนออกมาได้มากกว่าแบบ Native condition จากนั้นเก็บส่วนน้ำใส (supernatant) จากการสกัดโปรตีนลูกผสมแบบ denature condition ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี ProBond™ Nickel-Chelating Purification System แบบวิธี affinity column chromatography หลังจากวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบ fusion protein ที่ขนาดประมาณ 36 กิโลดาลตัน (โปรตีน WSMoV-CP-Protein ขนาดประมาณ 31 กิโลดาลตัน และโปรตีน pBAD/HisA-6xHisTag ขนาดประมาณ 5 กิโลดาลตัน) แต่มีปริมาณน้อยเนื่องจากมีโปรตีนอื่น ๆ ปนเปื้อนค่อนข้างมาก และวัดความเข้มข้นของ fusion protein ด้วยเครื่อง Microplate spectrophotometer (Multiskan™ Go,Thermo Scientific, USA) ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ได้ความเข้มข้นค่อนข้างต่ำเพียง 0.244 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยทั่วไปความ

เข้มข้นของโปรตีนที่เหมาะสมสำหรับการฉีดกระต่ายเพื่อแอนตินบอดีอยู่ระหว่าง 0.3 – 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร [300 – 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร] สำหรับใช้เป็นแอนติเจนฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองให้ผลิตแอนตินบอดีต่อ Coat protein ของเชื้อไวรัส WSMoV

6. ผลการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีและการตรวจเชื้อไวรัส WSMoV

การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ WSMoV โดยใช้ recombinant WSMoV coat protein ฉีดเข้าสู่กระต่ายบริเวณกล้ามเนื้อ (immunized muscular) แล้วทำการเก็บแอนติซีรัมทั้งหมด 5 ครั้ง ปริมาณรวม 50 มิลลิลิตร จากการตรวจหาค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมที่เก็บมาทั้งหมด 5 ครั้ง ด้วยเทคนิค indirect ELISA พบว่า มีค่าไตเตอร์สูงสุด 16,384 เท่า เมื่อนำแอนติบอดีมาตรวจสอบความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส โดยใช้ตรวจตัวอย่างแตงโม ส่วนยอด ใบ กิ่งก้าน ขั้วผล และผิวผล จากจังหวัดขอนแก่น ที่เป็นโรคจากเชื้อไวรัส WSMoV พบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีสามารถตรวจเชื้อไวรัส WSMoV ได้ แต่พบว่าเกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กับตัวอย่างแตงโมปกติค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดตรวจแบบ DAS-ELISA Kit ยี่ห้อ Agdia (ตารางที่ 2) ดังนั้นโพลีโคลนอลแอนติบดีที่ผลิตได้ในครั้งนี้จึงยังไม่มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับแอนติบอดีที่มีจำหน่ายเพื่อการค้าเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับตัวอย่างพืชปกติซึ่งอาจทำให้มีการแปลผลการตรวจผิดพลาดได้ หากผู้ทดสอบไม่คุ้นเคยกับเชื้อไวรัส WSMoV หรือเพื่อลดการการปฏิกิริยากับตัวอย่างพืชปกติอาจมีความจำเป็นต้องการเจือจางแอนติบอดีกับตัวอย่างพืชปกติ(cross-absorption) ก่อนนำไปใช้

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

โปรตีนลูกผสมส่วน coat protein ของเชื้อไวรัส *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) ที่ถูกผลิตในระบบเซลล์แบคทีเรียสามารถกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส WSMoV มีค่าความเจือจางของแอนติซีรั่มสูงสุดที่ 16,384 เท่า ตรวจพบเชื้อไวรัสได้ในส่วนของ ยอด ใบ กิ่งก้านและผิวผลของแตงโม แต่พบว่าเกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กับตัวอย่างแตงโมปกติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดตรวจแบบ DAS-ELISA Kit (Agdia® Inc) ดังนั้นการทำ cross-absorption สามารถเพิ่มความแม่นยำในการตรวจเชื้อไวรัสในตัวอย่างพืชได้

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

- สามารถตรวจรับรองเมล็ดพันธุ์แตงลูกผสมที่ต้องส่งออกไปยังต่างประเทศในกรณีที่เชื้อไวรัส WSMoV ที่อาจถ่ายทอดโรคไปด้วยเมล็ด
- เป็นประโยชน์กับเกษตรกรผู้ปลูกพืชตระกลูแตง หากเกษตรกรมีเมล็ดพันธุ์ที่สะอาดไปปลูกจะเป็นการลดความเสียหายที่จะเกิดขึ้นกับผลผลิต และเป็นการลดแหล่งสะสมของโรคในแปลงปลูก

กลุ่มเป้าหมาย

- หน่วยงานและนักวิชาการที่เกี่ยวข้องทั้งภาคภาครัฐและภาคเอกชน
- เกษตรกร

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี) : -

12. เอกสารอ้างอิง

วิมล สีเทา พิสสวรรณ เจียมสมบัติ อรประไพ คชนันทน์ อัญจนา บุญชด นุชนาถ วารินทร์ ปิยาภรณ์ เพชรสูงเนิน และชาญณรงค์ ศรีภิบาล. 2547. การจำแนกทอสโพไวรัสที่พบในพริก มะเขือเทศ และพืชตระกูลแตง. น. 445-451. ใน เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42: สาขาพืช สาขาส่งเสริมและนิเทศศาสตร์เกษตร. 1-4 กุมภาพันธ์ 2547 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

วิมล สีเทา. 2548. การตรวจวินิจฉัยและจำแนกทอสโพไวรัสของพริก มะเขือ แตงโม และถั่วลิสง ที่พบในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เกษตรศาสตร์). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.

วิมล สีเทา พิสสวรรณ เจียมสมบัติ โสภณ วงศ์แก้ว อรประไพ คชนันทน์ อัญจนา บุญชด นุชนาถ วารินทร์. 2548. การตรวจพบทอสโพไวรัสสองชนิดเข้าทำลายพืชร่วมกันในประเทศไทย. น. 558-564. ใน เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43: สาขาพืช. 1-4 กุมภาพันธ์ 2548.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ศลิษฎ์ ศุภกิจธนากร และอรอุมา เรืองวงษ์. การตรวจสอบเชื้อไวรัสในเมลอนและแคนตาลูปที่ปลูกในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และลาพูน. 2562. วารสารเกษตร 35(1): 75 – 85.

พิสสวรรณ เจียมสมบัติ อรประไพ คชนันทน์ รัชนี ฮงประยูร อัญจนา บุญชด วิมล สีเทา นุชนาถ วารินทร์ ชาญณรงค์ ศรีภิบาล และปิยาภรณ์ เพชรสูงเนิน. 2549. ความหลากหลายของทอสโพไวรัสที่พบในประเทศไทยและเพลี้ยไฟที่เป็นพาหะนำโรค. น. 42-48 ใน เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44 : สาขาพืช. 30 มกราคม - 2 กุมภาพันธ์ 2549 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

อรประไพ คชนันทน์ ชาญณรงค์ ศรีภิบาล สุภาวิณี ปานสอาด อัญจนา บุญชด นุชนาถ วารินทร์ อรวรรณ หิมานันโต ปรียพรรณ พงศาพิชณ์ พิสสวรรณ เจียมสมบัติ และ รัชนี ฮงประยูร. 2549. การผลิตแอนติบอดีเพื่อตรวจเชื้อทอสโพไวรัสที่พบในประเทศไทย. น.556-563. ใน เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44 : สาขาพืช. 30 มกราคม - 2 กุมภาพันธ์ 2549 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

Ie, T.S. 1970. Tomato Spotted wilt Virus. C.M.I./A.A.B. Plant Virus Deseription

No. 39. 4 p.

Cortes, I., I.C. Livieratos, A. Derks, D. Peters and R. Kormelink. 1998. Molecular and serological characterization of iris yellow spot virus, a new distint tospovirus species. Phytopathology 88: 1276-1282.

Chen CC, Shy JF, Yeh SD, 1990. Thrips transmission of Tomato spotted wilt virus from watermelon. Plant Protection Bulletin 32, 331–332.

German, T.L., D.E. Ullman and J.W. Moyer. 1992. Tospovirus: diagnosis, molecular biology, phylogeny and vector relationships. Annual Review of Phytopathology. 30 :315-348.

Okuda M, Takeuchi S, Taba S, Kato K, Hanada K, 2002. Melon yellow spot virus and Watermelon silver mottle virus: outbreak of cucurbit infecting tospovirus in Japan. Acta Horticulture 588, 143-148.

Peter, D. and R. Goldbach. 1995. The biology of tospoviruses, pp. 199-210. In R. P. Singh and K. Kohmoto (eds.) Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases. Histopathological, Biochemical, Genetic and Molecular Bases Volume III : Viruses&Viroide. Elsevier Science Ltd., Kidlington, Oxford.

Pongsapich, P. and P. Chiemsombat. 2002. Characterization of tospovirus infecting tomatos in
Thailand revealed the presence of serogroup IV-tospovirus but not serogroup I-tomato spotted wilt virus. pp. 92. In The First International Conference on Tropical and Subtropical Plant Disease. Chaing Mai, Thailand.

Rao X., Liu Y., Wu Z. and Li Y. 2011. First report of natural infection of watermelon by Watermelon silver mottle virus in China. New Disease Reports. p 12. [doi:10.5197/j.2044-0588.2011.024.012]

Yeh SD, Lin YC, Cheng YH, Jih CL, Chen MJ, Chen CC, 1992. Identification of tomato spotted wilt-like virus infecting watermelon in Taiwan. Plant Disease 76, 835-840. [doi:10.1094/PD-76-0835.]

13. ภาคผนวก

Table 1 Primers for WSMoV-CP adapter synthesis (WSMoV-CP-F3 (PstI)/WSMoV-CP-F3 (EcoRI)

Primer Name	Primer Sequences 5' ➡ 3'	bp	Tm °C	Product Size (bp)
WSMoV-CP-F3 (PstI)	GAG AT CTGCAG C ATG TCT AAC GTT AAG CAG CTT	33	72-73	~ 950
WSMoV-CP-F3 (EcoRI)	TGC TTA GAATTC C TTA CAC TTC CAA GGA AGT GCT	34		

Table 2 Efficiency of Polyclonal Antibody Ab-WSMoV-CP Against WSMoV Viruses in Watermelon Samples with Indirect ELISA Technique

Samples	Ab-WSMoV-CP/1	Ab-WSMoV /2
Shoots	1.460/3	3.056
Leaves	1.384	2.871
Vines	0.673	2.521
Rinds	0.442	1.643
WSMoV samples (Agdia®) (positive control)	1.803	3.299
Buffer (negative control)	0.138	0.018
Healthy watermelon (negative control)	0.364	0.103

Note

/1 means: an antibody produced using a recombinant WSMoV coat protein in this experiment

/2 means: WSMoV antibody purchased from Agdia® Inc.

/3 means: Absorbance (optical density) at 405 nm

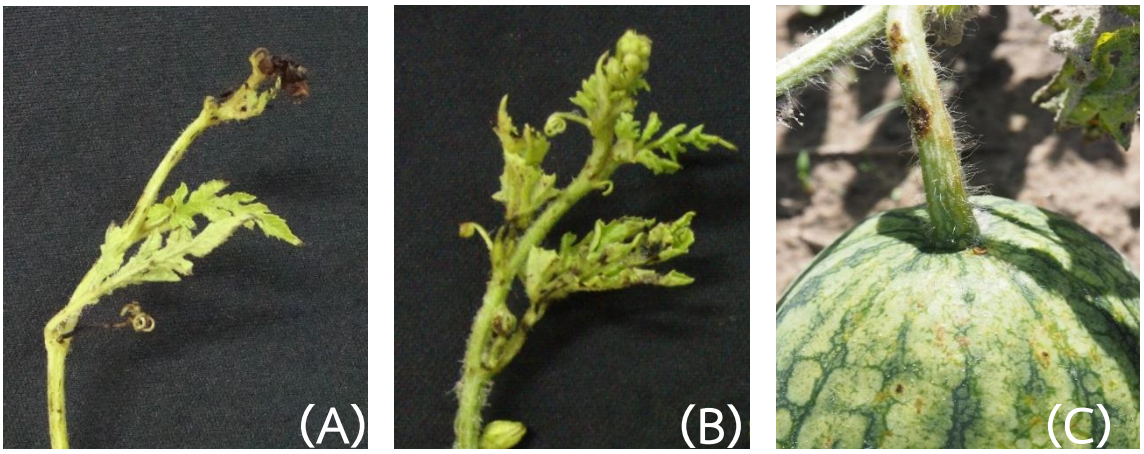

Figure 1 Watermelon infected by WSMoV (A-C) showed water-soaked, black necrotic patches on shoots, leaves, vines, tendrils tissues.

Figure 2 Watermelon fruit exhibited water-soaked transparent raised spot and uneven yellow mosaic rind (A-B), Necrotic spots coalesced and turned into dark brown or white spots.

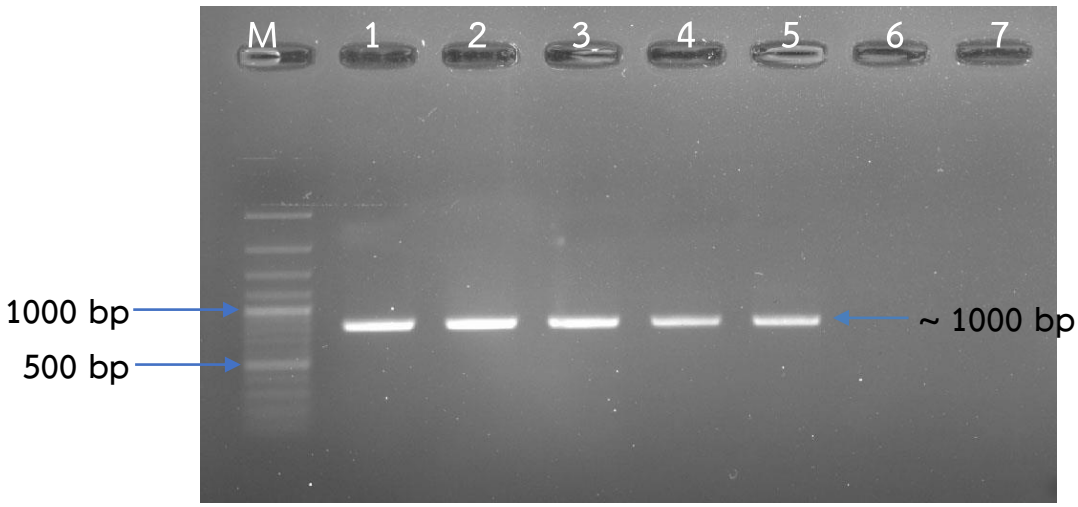

Figure 3 Gel electrophoresis of RT-PCR products of WSMoV N gene using WSMoV-N-F3/ WSMoV-N-R3 primers

M = 100 bps DNA ladder (fermentas®)

1 = infected watermelon shoots

2 = infected watermelon leaves

3 = infected watermelon vines

4 = infected watermelon tendrils

5 = infected watermelon rinds

6 = healthy watermelon (negative control)

7 = dH2O (negative control)

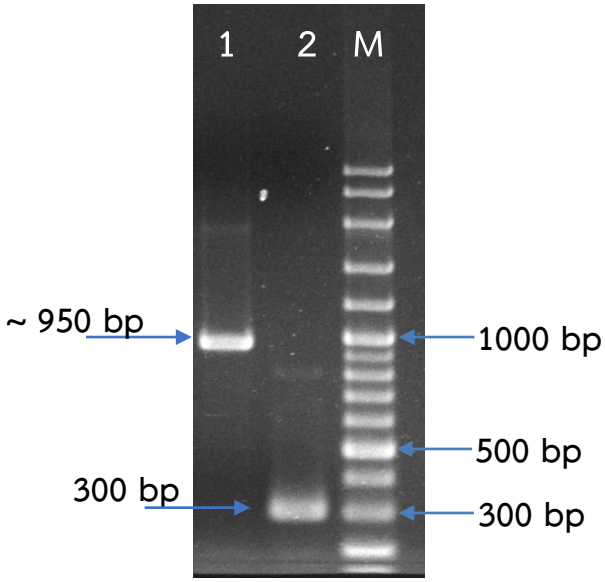

Figure 4 Gel electrophoresis of WSMoV-CP gene/6xHisTag plasmid using pBad-F / pBad-R primers by colony PCR

M = 1 kp DNA Ladder (fermentas®)

1 = pBad/HisA Expression vector inserted wiht WSMoV-CP gene/6xHisTag ~ 950 bp

2 = pBad/HisA Expression vector without WSMoV-CP gene/6xHisTag ~ 300 bp