แผนงานวิจัย : วิจัยและพัฒนาวิธรการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุลเพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร (โครงการวิจัยเดี่ยว)

โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาวิธรการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุลเพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร

กิจกรรม : การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติในประเทศเพื่อการป้องกันกำจัดและส่งออก

ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การผลิตแอนติซีรัมของเชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* (LYSV)

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Antiserum Production of *Leek yellow stripe virus* (LYSV)

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : สิทธิศักดิ์ แสไพศาล[1]

บทคัดย่อ

การสังเคราะห์โปรตีน Leek yellow stripe virus -coat protein gene (LYSV-CP gene) โดยใช้ฐานข้อมูลของ GenBank: ในส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ coat protein (NCBI Reference Sequence: NP_734102.1) จำนวน 863 bp แปลรหัสได้กรดอะมิโนจำนวน 288 residues โปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 32.18 KDa ทำการโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส LYSV-CP gene ที่ได้เข้าสู่ expression vector pET 100/D-TOPO® (Invitrogen) และถ่ายฝากเข้าเชื้อแบคทีเรีย E. coli สายพันธุ์ K12 DH10BTMT1R จากนั้นแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์โดย Ni-NTA column และหาขนาดโปนตีนที่ได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ผลการตรวจสอบหาแถบโปรตีนพบขนาดประมาณ 32 KDa และนำโปรตีนที่ได้ใช้เป็นแอนติเจนฉีดกระต่ายและเจาะเลือดตรวจสอบค่าไตเตอร์ของ แอนติซีรัมที่ได้ด้วยวิธี indirect ELISA พบว่าค่าไตเตอร์ที่ 1:6400 และ 1:102400 ได้ 1.373 และ 1.078 ตามลำดับ

คำหลัก: กระเทียม, เชื้อไวรัส, แอนติซีรัม

---

[1] สังกัด กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Protein synthesized Leek yellow stripe virus - coat protein gene (LYSV-CP gene) according to GenBank database (NCBI Reference Sequence: NP_734102.1) gene had 863 bp and was translated into 288 amino acid residue with molecular weight of 32.18 KDa. The LYSV-CP gene was cloned into pET 100/D-TOPO® (Invitrogen) expression vector and transferred to bacteria into the E. coli strain K12 DH10BTMT1R and induced for protein synthesis by IPTG. The protein was purified by Ni-NTA column using SDS-PAGE techniques find the protein size. The Result of detecting the protein strips is found approximately 32 KDa and the protein is used as an antigen injectable to rabbit and draw blood collection. Examination with indirect ELISA found that the titor of antiserum value 1:6400 and 1:102400 has 1.373 and 1.078 respectively.

Keywords: Galic, Leek yellow stripe virus (LYSV), antiserum

คำนำ

ปัจจุบันมีการปลูกกระเทียมเพิ่มมากขึ้น ซึ่งต้องประสบปัญหาการระบาดของแมลงและโรค ที่มีเชื้อสาเหตุมาจากเชื้อรา แบคทีเรีย ไส้เดือนฝอย รวมทั้งไวรัส ส่งผลกระทบต่อผลผลิตและคุณภาพของกระเทียม ซึ่งโรคไวรัสที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Leek yellow stripe virus* (LYSV) เป็นเชื้อในกลุ่ม Potyviruses เมื่อติดเชื้อ LYSV ในแปลงสามารถเข้าทำลายต้นหอมได้ถึง 100% (Bos, 1983) ส่วนการสูญเสียผลผลิตในกระเทียมสูงถึง 60% และสูงถึง 84% เมื่อติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นในกลุ่ม potyvirus ร่วมด้วย อัตราการงอกในกระเทียมได้รับผลกระทบและลดลงถึง 60% (Lot *et al*., 1998) ซึ่งโรคนี้มีเพลี้ยอ่อน *Myzus persicae* และ *Aphis fabae* เป็นพาหะนำโรคที่สำคัญ ทำให้เกิดการแพร่ระบาดในแปลงปลูกและเป็นแมลงปากดูดที่มีความสำคัญต่อการแพร่กระจายของเชื้อไวรัส (Lunello *et al*., 2002) ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงมีความต้องการผลิตแอนติซีรัมที่เฉพาะเจาะจงต่อเชื้อไวรัส LYSV เพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัส LYSV โดยต้องทำการแยกเชื้อไวรัส มาทำการผลิตแอนติซีรัมและทำให้แอนติซีรัมบริสุทธิ์ ก่อนนำไปทดสอบความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อไวรัส LYSV ก่อนนำแอนติซีรัมที่มีความเฉพาะเจาะจงนั้นไปใช้ในการตรวจสอบด้วยวิธีการทางเซรุ่มวิทยาต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- เครื่อง centrifuge
- ยีนสังเคราะห์ coat protein gene (CP) ของ *Leek yellow stripe virus* (LYSV)
- พลาสมิดพาหะ (cloning และ expression vectors)

- เครื่อง Spectrophotometer

วิธีการ

1. สำรวจและเก็บตัวอย่างกระเทียมจากแปลงปลูกของเกษตรกร

เก็บตัวอย่างกระเทียมที่มีอาการของเชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* (LYSV) เพื่อเตรียมแอนติเจนทำการเก็บตัวอย่างกระเทียมที่พบลักษณะอาการใบด่าง เป็นขีด จากแปลงปลูกของเกษตรกรในพื้นที่ปลูกกระเทียม เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัส LYSV และทำการเตรียมต้นพืชปลอดโรคและเป็นโรค รวมทั้งปลูกพืชทดสอบเพื่อเตรียมเพิ่มปริมาณเชื้อ

2. การเตรียมแอนติเจนด้วยการสังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส LYSV จากฐานข้อมูล GenBank

เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์โปรตีน จึงได้ทำการสั่งสังเคราะห์โปรตีน LYSV coat protein gene (LYSV-CP gene) โดยใช้ฐานข้อมูลของ GenBank : *Leek yellow stripe virus,* complete genome, NCBI Reference Sequence: NC_004011.1 ในส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ coat protein และจากนั้นจึงสั่งโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (coat protein gene, CP) ที่ได้นั้นเข้าสู่ expression vector pET100/D-TOPO® (Invitrogen) โดยบริษัท Invitrogen หลังจากได้โคลนที่มี LYSV-CP gene แทรกอยู่ใน pET100/D-TOP expression vector แล้วจึงนำพลาสมิดนั้นมาถ่ายฝากเข้าเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ K12 DH10B^{TM}T1R ด้วยวิธี heat shock transformation (Sombrook and Russel, 1989) นำไปเลี้ยงบนอาหาร 2XYT agar ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร คัดเลือกโคโลนีเพื่อตรวจหาส่วนของ LYSV-CP gene โดยวิธี PCR ก่อนนำไปสังเคราะห์โปรตีนในขั้นตอนต่อไป

3. การชักนำการสังเคราะห์ recombinant protein ในเซลล์แบคทีเรียและ แยกโปรตีนของเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column

เลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* K12 DH10B^{TM}T1R ที่มี LYSV-CP gene แทรกอยู่ใน pET 100/D-TOP expression vector ในอาหารเหลว 2XYT 100 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร เขย่า 170 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็น starter จากนั้นแบ่งใส่ในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 1 ลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ ลิตร ในอัตราส่วนของเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร เขย่าต่ออีก 3 ชั่วโมง (เก็บตัวอย่างเซลล์ก่อนเติม IPTG) จากนั้นเติม Isopropyl-β-D thiogalactopyranoside (IPTG) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อชักนำให้เกิดการสร้างโปรตีน โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงเชื้อต่อโดยการเขย่าบนเครื่อง shaker เป็นเวลา 2 4 6 8 และ 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการแสดงออกของยีนจากนั้นทำการเก็บเซลล์ที่เวลาต่างๆ โดยนำมาปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ 8,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใสและนำตะกอนมาผสมกับน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (ตะกอน 1 กรัม/น้ำ 10 มิลลิลิตร) จากนั้นเติม lysozyme เพียงเล็กน้อยประมาณ

เท่าหัวไม้ขีดไฟ (ต่ออาหารเหลว 1 ลิตร) และกวนให้เข้ากันจนเหนียว เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นนำมาเติมด้วย lysis buffer (Buffer B:50 mM $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 10 mM Tris-HCl (MW=121.1) และ 8 M Urea, pH 8.0) ในอัตรา 50 มิลลิลิตร/อาหารเหลว 1 ลิตร และนำมาทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator แบบ probe (power 45-50, cycle 50%) ครั้งละ 5 นาที จนกว่าเซลล์จะหายหนืดและใส แล้วนำไปปั่นที่ 10,000 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บน้ำใสไปแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column (อัตรา 2 มิลลิลิตร/อาหารเหลว 1 ลิตร) เริ่มจากการล้าง column หลังแพ็คแล้ว ด้วย buffer B จากนั้นเทส่วนน้ำใสให้ผ่าน column และล้าง column ด้วย buffer C (pH 6.3) และ buffer D (pH 5.9) ก่อนที่จะใส่ buffer E (pH 3.9) เพื่อแยกโปรตีนออกจากเจลใน column เก็บเป็น fraction หลอดละ 500 ไมโครลิตร เพื่อนาไปตรวจสอบขนาดของโปรตีนว่าอยู่ใน fraction ใด โดยเทคนิค sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

4. การผลิตแอนติซีรัมในสัตว์ทดลอง

ผสมโปรตีนของเชื้อที่บริสุทธิ์ (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) กับ complete Freund's adjuvant ในอัตรา 1:1 ให้เข้ากันเป็น emulsion สำหรับการฉีดกระต่ายครั้งแรก และใช้ incomplete Freund's adjuvant ในอัตรา 1:1 สำหรับการฉีดครั้งต่อๆ ไปอีก 4 ครั้ง การฉีดทุกครั้งเป็นการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) บริเวณคอ ประมาณ 4-5 จุดต่อการฉีดแต่ละครั้ง ทำการฉีดทุก 2 สัปดาห์ เริ่มทำการเจาะเลือดที่เส้นเลือดบริเวณใบหู หลังจากการฉีดครั้งที่ 2 และดำเนินการเจาะเลือดทุก 1 สัปดาห์อีก 6 ครั้ง น้ำเลือดที่เจาะได้มาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปเก็บที่ 4 °C อีก 24 ชั่วโมง รินส่วนน้ำใสมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 g นาน 10 นาที เก็บน้ำใสที่เป็นส่วนของแอนติบอดีไว้ที่ -80 °C จากนั้นทำการทดสอบและหาค่าไทเทอร์ (titer) ของแอนติซีรัม โดยวิธี Indirect ELISA เริ่มจากการหยอดแอนติเจน (recombinant protein 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS-T buffer (PBS+0.05% Tween 20) 3 ครั้ง แล้วนำมาเติมด้วย Blocking buffer (1% BSA ใน PBS-T) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างอีก 3 ครั้ง ใส่แอนติบอดีที่ได้จากการเจาะเลือดกระต่าย 7 ครั้ง โดยทำการเจือจางจาก 1:10 ถึง 1:204,800 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลทอีก 3 ครั้งก่อนนำมาหยอดด้วย Goat anti-rabbit IgG ที่ติดฉลากด้วย alkaline phosphatase เจือจาง 1:2,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลทอีก 3 ครั้งก่อนนำมาซับสเตรท p-nitrophenyl phosphstase หลุมละ 100 ไมโครลิตร อ่านผลด้วยเครื่องอ่าน ELISA ที่ค่าความดูดกลืนแสง 405 นาโนเมตร

5. การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตได้

การตรวจสอบเชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* (LYSV) โดยวิธี Indirect ELISA เริ่มจากนำ positive control ที่มีจำหน่ายจากบริษัท เคลือบหลุมของไมโครเพลท (microplate) ตามคำแนะนำของบริษัทโดยใช้ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 4°C ข้ามคืน แล้วนำไมโครเพลทมาล้างด้วย phosphate buffer saline ที่มี tween 20 ผสมอยู่ (PBS-Tween 20) 3 ครั้งๆละ 3 นาที หยอดแอนติซีรัมจากการเลือด

ครั้งที่ 5 ที่เจือจางใน conjugate buffer 1:100 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้างไมโครเพลทด้วย PBS-Tween 20 จานวน 3 ครั้งๆละ 3 นาที แล้วหยอด Goat-Anti Rabbit อัตรา 1: 2,000 ใน conjugate buffer 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง นำเพลทมาล้างอีก 3 ครั้งใน PBS-Tween 20 แล้วหยอด p-nitrophenyl phosphatase substrate (5 มิลลิกรัม/ substrate buffer 10 มิลลิลิตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร และอ่านผลด้วยเครื่องอ่านอิไลซา (ELISA Reader) โดยใช้เพลทชนิด polysorp microplate

เวลาและสถานที่

<u>ระยะเวลา</u> เริ่มเดือนตุลาคม 2561 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2562

<u>สถานที่</u> ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างกระเทียมจากแปลงปลูกของเกษตรกร

เก็บตัวอย่างใบกระเทียมที่มีอาการคล้ายโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* (LYSV) เป็นแถบสีเหลืองอ่อนที่ส่วนปลายใบและเป็นขีดๆ บนใบมีขนาดเล็กและทำให้เกิดแถบสีเหลืองผิดปกติบนใบ จากแปลงปลูกกระเทียมของเกษตรกรในพื้นที่ อ.ฝาง อ.ไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ ในเบื้องต้นได้ใช้ชุดตรวจสอบ POCY kit ของกล้วยไม้ทำการตรวจสอบตัวอย่างใบกระเทียมเนื่องจากเชื้อไวรัส LYSV เป็นเชื้อไวรัสที่จัดอยู่ในกลุ่ม Potyvirus ซึ่งผลการตรวจสอบพบเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus กับตัวอย่างใบกระเทียม จึงได้นำตัวอย่างใบกระเทียมดังกล่าวมาทำศึกษาต่อไป

2. การสังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส BYMV จากฐานข้อมูล GenBank

การสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ LYSV-CP gene โดยใช้ฐานข้อมูลของ GenBank : *Leek yellow stripe virus,* complete genome, NCBI Reference Sequence: NC_004011.1 ในส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ coat protein (NCBI Reference Sequence: NP_734102.1) ได้ลำดับ นิวคลีโอไทด์จำนวน 863 bp สามารถแปลรหัสได้กรดอะมิโนจำนวน 288 เรสิดิวส์ คือ

```
ageefdagaq anknqksgad kaieqrnpst sqasthgknd sssselsmgk dkdvnvgttg
tfsvprikqi sqkgiaipmd gersilnldh llhykpsqlc isntratrtq fmawkarlqd
eygvtasems iilnglmvwc iengtspnin gvwtmmdgee qvefplrpvv ehaqptlrqi
mahfsalaea yiemrnseqa ympryglqrn ltdmslarya fdfyevtsrt pvrareahaq
mkaaalrnsr prlfgldgnv ttmdedterh tahdvnarmh hldgahmq
```

ซึ่งเมื่อวิเคราะห์กรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม ProtScale (https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam) โปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 32.18 KDa จากนั้นจึงสั่งโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส LYSV-CP gene ที่ได้นั้นเข้าสู่ expression vector pET100/D-TOPO® (Invitrogen) โดยบริษัท Invitrogen

3. การชักนำการสังเคราะห์ recombinant protein ในเซลล์แบคทีเรีย และแยกโปรตีนของเชื้อ LYSV ให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column

การชักนำให้มีการสังเคราะห์ recombinant protein ด้วยการเติม IPTG: Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranoside เป็นเวลา 2 4 6 8 และ 24 ชั่วโมง แล้วนำมาวิเคราะห์หาโปรตีนและขนาดของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าภายหลังจากการเติม IPTG 8 ชั่วโมง เซลล์แบคทีเรียสามารถสร้าง recombinant protein ได้ในปริมาณมาก จากการตรวจสอบขนาดโปรตีนหลังแยกให้บริสุทธิ์โดย Ni-NTA column ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าในแต่ละ fraction ที่ทำการเก็บทั้งหมด จาก fraction ที่ F1-F9 พบว่ามีปริมาณโปรตีนใน fraction ที่ F2-F9 ที่สามารถพบแถบ recombinant protein CP-LYSV ที่มีขนาดประมาณ 32 KDa และจาก recombinant protein ที่ได้นั้นมีความบริสุทธิ์และได้ปริมาณโปรตีนเพียงพอสำหรับการนำไปใช้เป็นแอนติเจนในการฉีดสัตว์ทดลองเพื่อสร้างแอนติบอดี เนื่องจากโปรตีน CP-LYSV เป็นโปรตีนที่กระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันต่ำและเมื่อนำโปรตีน CP-LYSV ที่แยกได้บริสุทธิ์ไปฉีดเข้าสัตว์ทดลองจะทำให้ antigenic determinant ของโปรตีน CP-LYSV ยังคงเหมือนเดิม (Pillai *et al*., 1995) นำโปรตีนที่ได้ไปเป็นแอนติเจนนั้นต้องทำการตรวจคำนวณหาปริมาณของโปรตีนก่อน โดยทำการตรวจสอบและเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ตามวิธีวัดปริมาณโปรตีนของ Bradford (1976) โดยนำโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin, Sigma (BSA) ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน ตรวจสอบบน 15% SDS–PAGE และจากผลการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่ได้พบว่า สารละลายโปรตีนที่ได้นั้นมีความเข้มข้นประมาณ 1.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำไปผสมกับ Freund's adjuvant ครั้งละ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นแอนติเจนฉีดเข้ากระต่ายเพื่อให้มีการสร้างแอนติบอดีและนำแอนติบอดีที่ได้ไปศึกษาทางด้านเซรุ่มวิทยาต่อไป

4. การผลิตแอนติซีรัมด้วยการฉีดกระต่ายและการทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตได้

ดำเนินการฉีดกระต่ายที่สะโพกจำนวน 5 ครั้ง เริ่มเก็บแอนติซีรัมที่ใบหูกระต่ายในสัปดาห์ที่ 2 หลังฉีดแอนติเจนจนครบ ทำการเก็บเลือด (เก็บเลือดครั้งละประมาณ 10-15 มิลลิลิตร) และนำเลือดที่ได้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วใช้เข็มกรีดตามขอบด้านในของบีกเกอร์ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืน หลังจากนั้นจึงนำไปแยกส่วนใสจากก้อนเลือด ปั่นเหวี่ยงที่ 6720xg นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนเม็ดเลือดแดง เก็บส่วนใสที่เป็นแอนติซีรัมที่ได้แบ่งเก็บแช่ที่ -20 °C และผสม 0.02% โซเดียมเอไซด์ เก็บที่ 4 °C หลังจากที่ได้แอนติซีรัมมาแล้ว ทำการตรวจสอบไตเตอร์ของแอนติซีรัมที่ได้ด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้โปรตีน CP-LYSV ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมที่เจือจางระดับต่างๆ ตั้งแต่ 1:100-1:102400 พบว่า ค่าไตเตอร์จากการเจาะเลือดครั้งที่ 4 และ 5 สูงกว่าครั้งที่ 1, 2 และ 3 โดยครั้งที่ 4 มีค่าไตเตอร์ 1:6400

ซึ่งวัดค่าด้วยเครื่องอ่าน ELISA reader (Thermo Fisher Scientific: Version 1.00.40, Finland) ที่ A_{405} ได้ 1.373 และครั้งที่ 5 มีค่าไตเตอร์ 1:102400 ซึ่งวัดค่า ELISA ที่ A_{405} ได้ 1.078

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

สังเคราะห์โปรตีน LYSV coat protein gene (LYSV-CP gene) โดยใช้ฐานข้อมูลของ GenBank : *Leek yellow stripe virus*, complete genome, NCBI Reference Sequence: NC_004011.1 ในส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ coat protein (NCBI Reference Sequence: NP_734102.1) ได้ลำดับ นิวคลีโอไทด์จำนวน 863 bp สามารถแปลรหัสได้กรดอะมิโนจำนวน 288 เรสิดิวส์ พบโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 32.18 KDa จากนั้นโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส LYSV-CP gene ที่ได้เข้าสู่ expression vector pET 100/D-TOPO® (Invitrogen) โดยบริษัท Invitrogen และนำมาถ่ายฝากเข้าเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ K12 DH10BTMT1R แยกโปรตีนให้บริสุทธิ์โดย Ni-NTA column ด้วยเทคนิค SDS-PAGE จากการทดลองพบแถบโปรตีนขนาด 32.18 KDa และนำโปรตีนที่ได้เป็นแอนติเจนสำหรับการฉีดกระต่ายและเจาะเลือดเพื่อผลิตแอนติซีรัมที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส โดยทำการฉีดจำนวน 5 ครั้ง ทำการตรวจสอบไตเตอร์ของแอนติซีรัมที่ได้ด้วยวิธี indirect ELISA พบว่า ค่าไตเตอร์จากการเจาะเลือดครั้งที่ 4 และ 5 สูงกว่าครั้งที่ 1, 2 และ 3 โดยครั้งที่ 4 มีค่าไตเตอร์ 1:6400 ซึ่งวัดค่าด้วยเครื่องอ่าน ELISA reader ที่ A_{405} ได้ 1.373 และครั้งที่ 5 มีค่าไตเตอร์ 1:102400 ซึ่งวัดค่า ELISA ที่ A_{405} ได้ 1.078

ซึ่งจากผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการผลิตแอนติซีรัมสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัส LYSV ได้อย่างมีความเฉพาะเจาะจงด้วยวิธีการทางเซรุ่มวิทยา นอกจากนั้นแอนติซีรัมที่ผลิตขึ้นได้นี้ยังสามารถเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำไปใช้ในการตรวจหาเชื้อ LYSV นอกเหนือจากแอนติบอดีที่มีจำหน่ายในท้องตลาดที่นำเข้ามาจากต่างประเทศและจำหน่ายในราคาที่แพง

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, 2554, โรคผักและการป้องกันกำจัด, หน้า 138.

วิกิพิเดีย สารานุกรมเสรี (2557). กระเทียม สืบค้นเมื่อวันที่ 2 มิถุนายน 2557 Web site: http://th.wikipedia.org/wiki/กระเทียม

Bos, L. 1983. Viruses and virus diseases of Allium species. Acta Horticulturae 127:11-29.

Bos, L., Huijberts, N., Huttinga, H., and Maat, D.Z. 1978. Leek yellow stripe virus and its relationships to Onion yellow dwarf virus - characterization, ecology, and possible control. Netherlands Journal of Plant Pathology 84(5): 185-204.

Lot, H., Chovelon, V., Souche, S., and Delecolle, B. 1998. Effects of onion yellow dwarf and leek yellow stripe viruses on symptomatology and yield loss of three French garlic cultivars. Plant Disease 82(12): 1381-1385.

Lunello, P., Ducasse, D.A., Heiguera, M., Nome, S.F., and Conci, V.C. 2002. An Argentineanisolate of Leek yellow stripe virus from leek can be transmitted to garlic. Journal of Plant Pathology 84(1): 11-17.

Figure 1 Symptoms of *Leek yellow stripe virus* (LYSV) on Galic

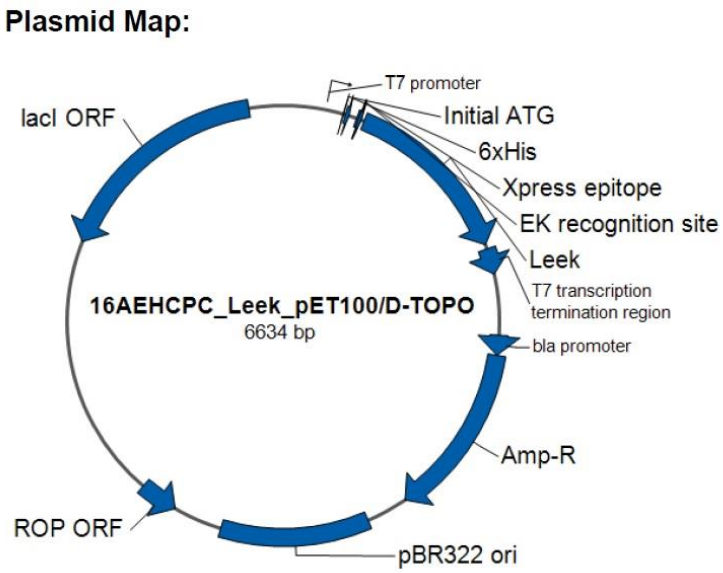

Figure 2 Transformation of LYSV CP gene (863 bp) into the plasmid pET 100/D-TOPO®