การผลิตแอนติซีรัมของไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus*-1 สาเหตุโรคเหี่ยวสับปะรดโดยใช้ระบบเซลล์แบคทีเรีย

Antiserum production of *Pineapple mealybug wilt-associated virus*-1causing pineapple wilt disease by bacterial cell system

วันเพ็ญ ศรีทองชัย[1/] ศรีเมฆ ชาวโพงพาง[2/] กาญจนา วาระวิชะนี[1/]

[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2/]ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รายงานความก้าวหน้า

นำใบสับปะรดที่เป็นโรคเหี่ยวมาแยกสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป (MasterPure™RNA Purification Kit) แล้วนำไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์จากส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส PMWaV-1 ได้แก่pet101_PMWaV1F (5'CACCATGGCTGATTCGAGCAAACAAAAACAAC3') และ pet101_PMWaV1R (5'TTTG CGTCCACCCATAAAGATGTGCG3') สังเคราะห์ ได้ชิ้นของดีเอ็นเอ ขนาด 771 คู่เบส จากนั้นนำไปโคลนเข้าสู่ เวคเตอร์ pET 101/D-TOPO® (Invitrogen) และคัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปใน vector นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี Miniprep แล้วส่งไปตรวจสอบลำดับเบส พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ 771 คู่เบส ขณะนี้กำลังดำเนินการคัดเลือกโคลนที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ในเซลล์ของ *E. coli* ในอาหาร 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร- และใช้สาร Isopropyl-β-D thiogalactopyranoside (IPTG) ในการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-03-01-01-54

คำนำ

สับปะรด [*Ananas comosus* (L.) Merr.] อยู่ในวงศ์ Bromeliaceae เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย สามารถปลูกและเก็บผลผลิตได้ตลอดปี เพื่อใช้บริโภคสดภายในประเทศและแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ มีมูลค่าส่งออกประมาณปีละ13,000-15,000 ล้านบาท โดยประเทศไทยครองความเป็นผู้นำในการผลิตและส่งออกสับปะรดเป็นอันดับหนึ่งของโลก เป็นเวลานานกว่า 10 ปี จนถึงปัจจุบัน โดยมีตลาดผู้นำเข้าที่สำคัญ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา สหภาพยุโรป ญี่ปุ่น และสาธารณรัฐประชาชนจีน (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2547)

ศัตรูพืชเป็นอุปสรรคสำคัญในการปลูกสับปะรด ทำให้ผลผลิตและคุณภาพสับปะรดเสียหายอย่างรุนแรง จนบางครั้งไม่สามารถเก็บผลผลิตได้ ศัตรูสำคัญที่สุดที่กำลังเป็นปัญหาสำคัญต่อการปลูกสับปะรดของไทยในปัจจุบัน ได้แก่ โรคเหี่ยวสับปะรด (Pineapple wilt disease หรือ Mealybug wilt of pineapple) พบระบาดเป็นครั้งแรกในรัฐฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา เมื่อต้นปี พ.ศ. 2443 และปัจจุบันโรคนี้แพร่ระบาดทั่วไปในประเทศที่มีการปลูกสับปะรดเป็นการค้า เช่น ออสเตรเลีย ไทย และคิวบา เป็นต้น สำหรับประเทศไทยมีรายงานว่าพบการระบาดของโรคเหี่ยวในแหล่งปลูกสับปะรดของจังหวัดชลบุรีตั้งแต่ปี พ.ศ. 2532 และทำความเสียหายให้แก่ผลผลิตอย่างสูง ต่อมาในปี พ.ศ. 2546 โรคนี้ระบาดรุนแรงในแปลงปลูกสับปะรดของภาคตะวันตกบริเวณจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และเพชรบุรี ซึ่งเป็นแหล่งปลูกสำคัญของประเทศ โดยมีพื้นที่ปลูกสับปะรดเป็นอันดับ 1 และ 3 ของประเทศ คือ 492,058 และ 56,192 ไร่ ตามลำดับ จากพื้นที่ปลูกทั้งประเทศ 962,693 ไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2546; กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2547) นอกจากนี้เริ่มพบการเข้าทำลายของโรคนี้ในเขตจังหวัดชลบุรี ระยอง และตราด ซึ่งเป็นแหล่งปลูกสับปะรดที่สำคัญเพื่อส่งโรงงานแปรรูปของภาคตะวันออก พันธุ์ที่พบว่ามีการระบาดของโรคเหี่ยว คือพันธุ์ปัตตาเวีย หรือรู้จักแพร่หลายในนามสับปะรดศรีราชา ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มพันธุ์ Smooth Cayenne เป็นพันธุ์ที่ปลูกมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 70 ของผลผลิตรวมของสับปะรด เพราะนอกจากนิยมปลูกเพื่ออุตสาหกรรมแปรรูปแล้ว ยังเป็นพันธุ์ที่นิยมใช้บริโภคผลสดอีกด้วย (วันเพ็ญ, 2546)

โรคนี้เกิดจากไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWaVs ได้แก่ PMWaV-1 และ PMWaV-2) ซึ่งมีอนุภาคแบบท่อนยาวคด (flexuous rod) ขนาดประมาณ 1,200 X 12 นาโนเมตร กรดนิวคลีอิคเป็นแบบอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded RNA, ssRNA) และมีน้ำหนักโมเลกุล 8.35 x 10^6 ดาลตัน (dalton) จัดอยู่ในสกุล คลอสเตอโรไวรัส (*Closterovirus*) วงศ์คลอสเตอโรวิริดี (*Closteroviridae*) กระจายอยู่หนาแน่นเฉพาะภายในเซลล์ท่ออาหารของพืช (Beardsley, 1993)

ลักษณะอาการของโรค ใบเริ่มแสดงอาการอ่อนนิ่ม มีสีเขียวอ่อนหรือสีเหลือง ปลายใบแห้งตายเป็นสีน้ำตาลหรือสีแดงลามเข้าสู่โคนใบ (die back) ใบลู่ลงและแผ่แบนไม่ตั้งขึ้นเหมือนใบปกติ ต่อมาต้นเหี่ยวและแห้งตายในที่สุด รากมีขนาดสั้นและแตกแขนงน้อยมาก ทำให้ถอนต้นขึ้นมาได้ง่าย

ซึ่งตรงข้ามกับต้นปกติที่มีรากจำนวนมากยึดเกาะดินแน่น ทำให้ถอนต้นขึ้นมาได้ยาก ผลมีขนาดเล็กมากจนไม่สามารถเก็บเกี่ยวได้ (Dilokkunanant *et al.*, 1996) ในธรรมชาติพืชอาศัยที่สำคัญและอ่อนแอต่อไวรัส คือ สับปะรด และโรคนี้สามารถถ่ายทอดโดยมีเพลี้ยแป้ง [pink pineapple mealybug, *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) และ gray pineapple mealybug, *D. neobrevipes* (Beardsley)] เป็นพาหะ (German *et al*, 1992)

วิธีการที่สามารถใช้จำแนกไวรัส PMWaV-1 และ PMWaV-2 คือ วิธีอิมมูโนวิทยา (Immunology) โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อไวรัส PMWaV-1 และ PMWaV-2 (Sether & Hu, 2002) และวิธี RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับไวรัสแต่ละชนิด (Beardsley, 1993; Hu *et al.*, 1996) ซึ่งให้ผลที่แม่นยำ และรวดเร็ว แต่ต้องอาศัยความชำนาญเฉพาะด้านรวมทั้งต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงในการตรวจสอบหน่อพันธุ์สับปะรดเป็นจำนวนมาก และในฮาวายมีรายงานว่า สับปะรดจะแสดงอาการเหี่ยว เมื่อได้รับเชื้อไวรัส PMWaV-2 และไม่แสดงอาการของโรคถ้าได้รับเชื้อ PMWaV-1 เพียงชนิดเดียว แต่ถ้าได้รับเชื้อทั้งสองชนิดสับปะรดจะแสดงอาการเหี่ยวอย่างรุนแรง ฉะนั้นควรมีการผลิตแอนติซีรัมของ PMWaV-1 เพื่อใช้ในการคัดเลือกหน่อพันธุ์ปลอดโรคเพื่อนำไปปลูกในปริมาณมาก เพราะเป็นวิธีที่ง่าย ค่าใช้จ่ายไม่สูง และสามารถตรวจตัวอย่างได้ครั้งละเป็นจำนวนมาก แต่เนื่องจากปริมาณของคลอสเตอโรไวรัสในพืชมีน้อย ทำให้ประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตได้ยังไม่ดีที่สุด ในปัจจุบันอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพทำให้สามารถผลิตโปรตีนต่างๆในเซลล์แบคทีเรียในปริมาณมากได้ และมีความบริสุทธิ์สูง จึงเป็นการเพิ่มปริมาณแอนติเจนเพื่อนำไปผลิตแอนติซีรัมในสัตว์ทดลองต่อไป

Druka และคณะ (1996) รายงานการผลิตแอนติซีรัมจากชิ้นของ coat protein ยีน จากสายพันธุ์ข้าวของประเทศฟิลิปปินส์ โดยนำมาโคลนเข้า vector แล้วนำไปเชื่อมกับ MBP fusion proteins จากนั้นนำไปฉีดกระตุ้นกระต่ายให้สร้างแอนติบอดี แอนติซีรัมที่ผลิตได้สามารถตรวจวินิจฉัยไวรัสใบสีส้มรูปทรงกลมได้โดยวิธี ELISA, Western blotting และ IEM ต่อมา Cerovska และคณะ (2003) ได้ทำการผลิตโพลีคลอนอลแอนติบอดีจากยีนโปรตีนห่อหุ้มไวรัส (ยีน CP) ของเชื้อ *Potato mop-top virus* (PMTV) โดยโคลนชิ้นของยีน CP เข้าสู่ expression vector แล้วเพิ่มปริมาณโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* จากนั้นนำมาแยกให้บริสุทธิ์และฉีดเข้าสัตว์ทดลองเพื่อผลิตแอนติซีรัม จากการทดสอบพบว่าแอนติซีรัมที่ได้สามารถใช้ตรวจหาไวรัส PMTVได้ผลดีโดยใช้เทคนิค ELISA หรือ Osmar และคณะ (2004) ได้นำยีน CP ของเชื้อ *Apple stem grooving virus* (ASGV) มาเพิ่มปริมาณโดยเทคนิค RT-PCR นำไปโคลนใน vector ตรวจหาลำดับเบส และ โคลนเข้าสู่ expression vector แล้วเพิ่มปริมาณโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* จากนั้นนำมาแยกให้บริสุทธิ์และฉีดเข้าสัตว์ทดลองเพื่อผลิตแอนติซีรัม จากการทดสอบพบว่าแอนติซีรัมที่ได้สามารถใช้ตรวจหาไวรัส ASGV ได้ผลดีโดยใช้เทคนิค ELISA นอกจากนี้ ลำพึง และคณะ (2547) ได้ทำการสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสเส้นใบเหลืองกระเจี๊ยบเขียวในระบบเซลล์แบคทีเรีย และแยกโปรตีนออกจากเซลล์แบคทีเรีย และนำไปฉีดกระตุ้นกระต่ายทดลองเพื่อผลิตแอนติซีรัมที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรวจเชื้อไวรัสสาเหตุโรค

ฉะนั้นควรพัฒนาวิธีการผลิตแอนติซีรัมของ PMWaV-1 โดยอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพ ได้แก่ การโคลนยีน และนำมาเพิ่มปริมาณโปรตีนของเชื้อในเซลล์แบคทีเรีย ก่อนนำไปฉีดเข้ากระต่าย เพื่อให้ได้แอนติซีรัมที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับใช้ในการคัดเลือกหน่อพันธุ์ปลอดโรคเพื่อนำไปปลูกในปริมาณมาก

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ต้นสับปะรดที่เป็นโรคเหี่ยวที่เกิดจากไวรัส PMWaV-1
2. ไพรเมอร์
3. พลาสมิดพาหะ (cloning และ expression vectors)
4. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนของการโคลนยีน
5. กระต่าย อุปกรณ์และสารเคมีในการผลิตแอนติซีรัม
6. อุปกรณ์และสารเคมีในการตรวจสอบเชื้อ โดยวิธีทางเซรุ่มวิทยา

วิธีการ

1. การโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (coat protein gene, CP)

1.1 การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์ จำนวน 1 คู่ ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนใน ribosome ของ ไวรัสสาเหตุของโรคเหี่ยวสับปะรด (PMWaV-1) ได้แก่

pet101_PMWaV1F 5’ATGGCTGATTCGAGCAAACAAAAACAAC 3’

pet101_PMWaV1R 5’TTTGCGTCCACCCATAAAGATGTGCG3’

เพื่อนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอ ในกระบวนการ cloning เข้าสู่ vector

1.2 การแยกสกัดอาร์เอ็นเอของของไวรัสจากใบสับปะรด

โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป (MasterPure™RNA Purification Kit ของบริษัท EPICENTRE)

1. เก็บตัวอย่างพืช 1 – 5 มิลลิกรัม ใช้ทำได้ทันที หรือจะแช่เก็บที่ – 70 °ซ
2. ดูด Proteinase K (50 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร ทำให้เจือจางใน 300 ไมโครลิของ Tissue and Cell Lysis Solution (1 ตัวอย่าง) ใส่ 5 ไมโครลิตร ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร
3. บดตัวอย่างพืชใน ไนโตรเจนเหลว และเก็บใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร
4. เติมสารละลาย Tissue and Cell Lysis Solution ซึ่งผสมกับ Proteinase K แล้ว (ข้อ 2) 300 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากัน
5. นำไปบ่มที่ 65 °ซ นาน 15 นาที (ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex ทุกๆ 5 นาที) นำสารละลายเซลล์พืชที่ได้มาแช่ในน้ำแข็ง นาน 3 – 5 นาที

6. เติม MPC Protein Precipitation Reagent 175 ไมโครลิตร. ในสารละลายของ RNA ของเซลล์พืช 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex นาน 10 วินาที
7. นำมาปั่นที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที
8. ทิ้งตะกอน และเก็บส่วนใสใส่หลอดใหม่
9. เติม Isopropanal 500 ไมโครลิตร โดยต้องเย็นจัดโดยแช่ที่ -20 °ซ แล้วพลิกหลอดขึ้นลง 30-40 ครั้ง
10. นำสารละลายข้อ 9 มาปั่น 10,000 รอบ/นาที ที่ 4°ซ นาน 10 นาที
11. ล้างตะกอนด้วย 75 % ethanol 500 ไมโครลิตร แล้ว quick spin (ล้าง 2 ครั้ง)
12. dry ตะกอนใน 37°ซ นานประมาณ 2 ชั่วโมง
13. ละลายตะกอนของ RNA ที่ได้ใน TE buffer 15-20 ไมโครลิตร

1.3 การเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยเทคนิค RT-PCR

นำอาร์เอ็นเอของเชื้อที่ได้จากการแยกสกัด มาทำปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ที่มีความจำเพาะกับไวรัส PMWaV1 (Sether and Hu, 2002a) ได้แก่

pet101_PMWaV1F 5'CACCATGGCTGATTCGAGCAAACAAAAACAAC 3'

pet101_PMWaV1R 5'TTTGCGTCCACCCATAAAGATGTGCG3'

โดยใช้ปฏิกิริยาดังนี้

RT-PCR Profile

<u>20 ul. Reaction</u> (ใช้ชุดของ Bioneer)

dH_2O	6 ไมโครลิตร
Primer R (100 พิโคโมล)	1 ไมโครลิตร
RNA template	5 ไมโครลิตร
บ่มที่ 95 °ซ 3 นาที แล้วแช่บนน้ำแข็ง.อีก 5 นาที จากนั้นเติม	
5X RT buffer	4 ไมโครลิตร
10 mM dNTP	1 ไมโครลิตร
DTT	2 ไมโครลิตร
บ่มที่ 37 °ซ 10 นาที แล้วเติม	
M-MLV Reverse Transcriptase	1 ไมโครลิตร
บ่มที่ 45 °ซ 50 นาที	

PCR Profile

<u>50 ul. Reaction</u>

5x Phusion® HF buffer	10.0 ไมโครลิตร
10 uM dNTPs	2.0 ไมโครลิตร
Primer F (10 uM)	2.0 ไมโครลิตร

Primer R (10 uM)	2.0	ไมโครลิตร
dH_2O	32.5	ไมโครลิตร
Template (ที่ได้จาก RT-PCR)	2.0	ไมโครลิตร
Phusion® Hot Start II DNA Polymerase (2 Unit/ul)	0.5	ไมโครลิตร

นำหลอดที่ผสมปฏิกิริยามาใส่ในเครื่อง Thermal cycler เพื่อสังเคราะห์ cDNA ตาม program ดังนี้

95 °ซ	5 นาที	
95 °ซ	45 วินาที	35 รอบ
58 °ซ	45 วินาที	
72 °ซ	1 นาที	
72 °ซ	10 นาที	
25 °ซ	15 นาที	

ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วย 1.5 % agarose gel electrophoresis ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวล์ท ใน TAE บัฟเฟอร์ เป็นเวลา 30 นาที

1.4 การต่อเชื่อม (ligation) PCR product เข้าสู่ พลาสมิดพาหะ (plasmid vector)

นำ PCR product 2 ไมโครลิตร ผสมกับ เวคเตอร์ pET 101/D-TOPO® (Invitrogen) 1 ไมโครลิตร และ salt solution 1 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จากนั้นเติม competent cell 50 ไมโครลิตร (*E. coli* , DH5α) แช่ในน้ำแข็ง นาน 30 นาที แล้วทำการ heat shock cell โดยการแช่หลอดในน้ำที่มีอุณหภูมิ 42 °ซ นาน 90 วินาที ก่อนย้ายไปแช่บนน้ำแข็งทันที อีก 5 นาที เติมอาหาร 2XYT ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ก่อนนำไปเขย่าที่ 37°ซ นาน 60 นาที ดูดมา 50 ไมโครลิตร และเทแผ่ (spread) ลงบนอาหารแข็ง 2XYT Agar (ที่มี ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร) บ่มที่ 37 °C ข้ามคืน

1.5 การสกัดโคลนของพลาสมิด

คัดเลือกเฉพาะโคโลนีสีขาวบนอาหารแข็ง 2XYT โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ปราศจากเชื้อ แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว 2XYT (มี ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร ผสมอยู่) เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที ที่ 37°ซ ข้ามคืน นำเชื้อที่อยู่ในอาหารเหลว 1 มิลลิลิตร มาหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บตะกอนที่ได้มาละลายใน Solution I (25 mM Tris HCl pH 8.0, 50 mM glucose และ 10 mM EDTA) 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติม Solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS) 400 ไมโครลิตร เขย่าหลอดก่อนที่จะเติม Solution III (3 M potassium acetate pH 5.2) 3000 ไมโครลิตร และ chloroform : isoamyl alcohol (24 :1) 200 ไมโครลิตร เขย่าและแช่บนน้ำแข็ง 10 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยง ที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำส่วนของน้ำใสมา

เติมด้วยหนึ่งเท่าโดยปริมาตรของ isopropanol และนำไปหมุนเหวี่ยง ที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% ethanol และหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบและเวลาเท่าเดิม แล้วละลายตะกอนพลาสมิดด้วยน้ำ (มี RNase 2 % ผสมอยู่) 50 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่ 37 °ซ นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำพลาสมิดที่สกัดได้ส่งตรวจเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์

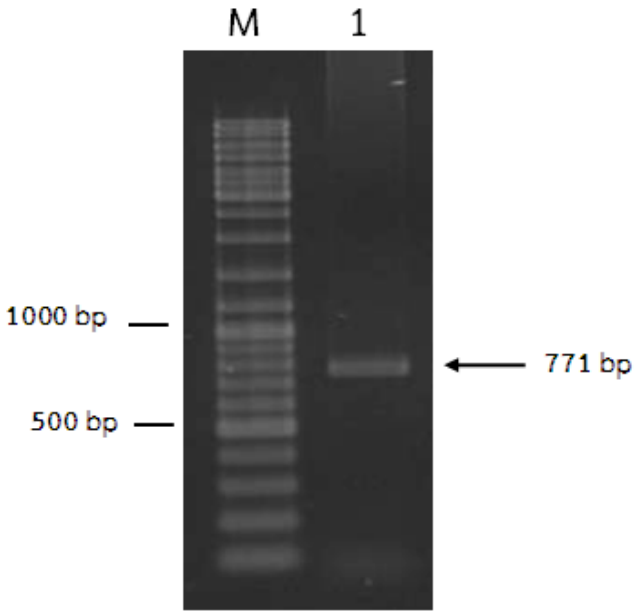
เวลาและสถานที่ ระยะเวลา ตุลาคม 2553 - กันยายน 2555
สถานที่ กลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (coat protein gene, CP)

ปริมาณอาร์เอ็นเอของใบสับปะรดที่เป็นโรคเหี่ยวที่เกิดจากไวรัส PMWaV-1 ที่ได้จากการสกัด และเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค RT-PCR ใช้ไพรเมอร์ pet101_PMWaV1 และ pet101_PMWaV1R จากการตรวจวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอ ด้วย agarose gel electrophoresis พบ แถบดีเอ็นเอขนาด 771 คู่เบส (bp) (ภาพที่ 1)

การตรวจสอบโคลนต่างๆของพลาสมิด pET 101/D-TOPO® (Invitrogen, ขนาด 5753 bp) หลังต่อเชื่อมกับ PCR product (771 คู่เบส) โดยการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส ด้วยเครื่อง Sequencer พบว่าเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส PMWaV-1(ภาพที่ 2)



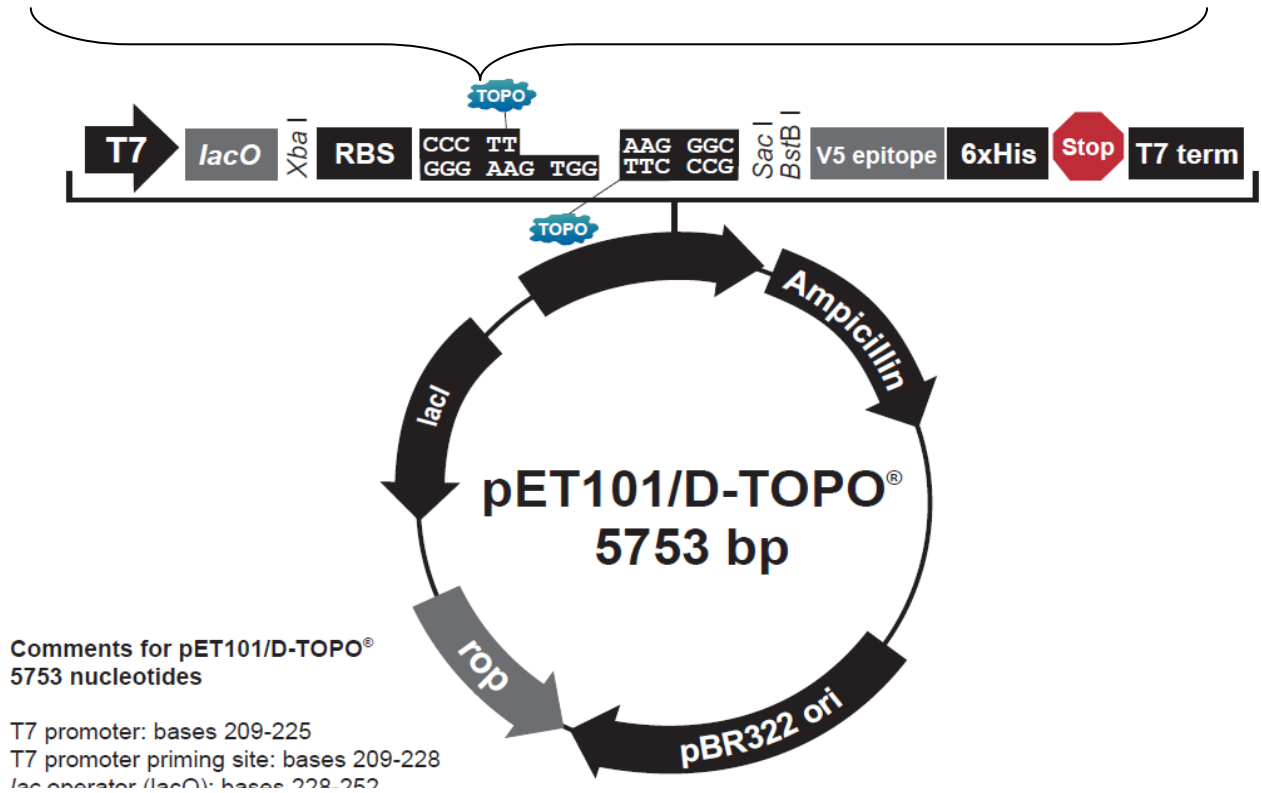
ภาพที่ 1. การเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส โดยใช้ไพรเมอร์ pet101_PMWaV1 และ pet101_PMWaV1R วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis

M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb Ladder, Fermentas)

1 = ดีเอ็นเอของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส จากสับปะรดที่เป็นโรคเหี่ยว

ภาพที่ 2. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (771 bp) ที่เชื่อมต่อเข้าสู่พลาสมิด pET 101/D-TOPO®

ATGGCTGATTCGAGCAAACAAAAACAACCTGAACATGCTGACTCTGGGCCTAAGACAG
TGGAAGACCAAGTCAAGGAAATAATGAACCTACCTGTGCCGGGAGGTAGGACTACTG
TGTCGACGTTTGAAGATTTGATAGCAGCCGAAAATGCTATAATTGATTTCACCAAGGTT
GATGTACCACGCATGATTAACGTTCCGATCCCAGGAATAGTTACTAATGCACACAAGG
TGATAGGATCCAAAGCTCTGTGGGAGTTGGGTAAATCGAAGGGTATATCAGAATCGGC
GAAACACATGATCCAATTTTTGATGCAATCTTTCCAAGATATGTGCACCTTTTCTACATC
ACCGAAAGTTTCGGCGACTCAGAACTACTCCACCACAGCTAAGTATGATGGTAAAGAT
GTTAACGTCACGCACGAGGAGATCAGAATTGCTTTGAGCAACTCACTATCCAATTTGG
GATACGATAATCCTATGAGACAGTTTGGGAGAGGTTTTACTTCCACAATTGTTCAAGGA
CTGAGTTCTGGGAAGTTGGTGGTTAACACTAGGATATGTACTAAGAACGGAGTACCGA
GGAATTATTACTCGTTCTATCCAGATTGCTTACACGTAGAAGCCAGAGTACACGGTGAT
GATGCAGCGTTGGTAAGTGAGTTAGCCAGAATGGTAGCCATAAACAGAGCAAACTCG
AGTGGTTCTGGCGAACACAACGTCTTTGAGAAGACGGCTGTGTCCCCGCACATCTTTA
TGGGTGGACGCAAA



สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

นำใบสับปะรดที่เป็นโรคเหี่ยวมาแยกสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป (MasterPure™RNA Purification Kit) แล้วนำไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์จากส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส PMWaV-1 ได้แก่pet101_PMWaV1F (5'CACC ATGGCTGATTCGAGCAAACAAAAACAAC 3') และ pet101_PMWaV1R (5'TTTGCGTCCACCC ATAAAGATGTGCG3') สังเคราะห์ ได้ชิ้นของดีเอ็นเอ ขนาด 771 คู่เบส จากนั้นนำไปโคลนเข้าสู่เวคเตอร์ pET 101/D-TOPO® (Invitrogen) และคัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปใน vector นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี Miniprep แล้วส่งไปตรวจสอบลำดับเบส พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ 771 คู่เบส ขณะนี้กำลังดำเนินการคัดเลือกโคลนที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ในเซลล์ของ *E. coli* ในอาหาร 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร- และใช้สาร Isopropyl-β-D thiogalactopyranoside (IPTG) ในการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2547. ยุทธศาสตร์สับปะรด Pineapple National Strategy 2547-2551. 51 หน้า.

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

วันเพ็ญ ศรีทองชัย. 2546. โรคเหี่ยว : ภัยคุกคามต่อการปลูกสับปะรดของไทย. วารสารโรคพืช (17) 1-2 : 48-53.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2546. สถิติการเกษตรของประเทศไทยปีเพาะปลูก 2544/2545. เอกสารสถิติการเกษตร เลขที่ 3/2545 กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 51 หน้า.

Beardsley, J.W. 1993. The pineapple mealybug complex; taxonomy, distribution and host relationships. *Acta Hort.* (ISHS) 334:383-386.

Cerovska, N., T. Moravec, P. Rosecka, P. Dedic and M. Filigarova. 2003. Production of polyclonal antibodies to a recombinant coat protein of *Potato mop-top virus. Journal of Phytopathology* 151 (4) : 195-200.

Dilokkunanant, U., S. Kladpan, R. Prateepasen and U. Suwanwong. 1996. Pineapple wilt disease in Thailand. *Thai. J. Agric.* 29: 337-348.

Druka, A., T. Burns, S. Zhang and R. Hull. 1996. Immunological characterization of rice tungro spherical virus coat proteins and differentiation of isolates from the Philippines and India. *J. Gen. Virology.* 77: 1975-1983.

German, T.L., D.E. Ullman and U.B. Gunashinghe. 1992. Mealybug Wilt of Pineapple. Chapter 7 *In* Advance in Disease Vector Besearch vol. 9. pp. 241-258 ed. by K.F. Harris. Springer-Verlag New York.

Hu, J.S., D.M. Sether and D.E. Ullman. 1996. Detection of pineapple closterovirus in pineapple plants and mealybugs using monoclonal antibodies. *Plant Pathology* . 45: 829-836.

Nickel Osmar, Maria, L.P.N. Targon, Thor V.M. Fajardo, Marcos A. Machado and A. Trivilin. 2004. Polyclonal antibodies to the coat protein of *Apple stem grooving virus* expressed in *Escherichia coli* : production and use in immunodiagnosis. *Fitopatologia Brasileira* 29 (5) : 558-562.

Sether, D.M. and J.S Hu. 2002. Closterovirus infection and mealybug exposure are necessary for the development of mealybug wilt of pineapple disease. *Phytopathology*. 92: 928-935.