การผลิตแอนติซีรัมของเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งส้มโดยใช้ระบบเซลล์แบคทีเรีย

Antiserum production of causal agent of citrus greening disease using bacterial cell system

วันเพ็ญ ศรีทองชัย ศรีเมฆ ชาวโพงพาง ดารุณี ปุญญพิทักษ์
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

แยกสกัดดีเอ็นเอจากเส้นกลางใบของแพงพวยที่เป็นโรคกรีนนิ่ง โดยใช้ CTAB buffer แล้วนำไปเพิ่มปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ใช้ไพรเมอร์จากส่วนของยีน outer membrane protein ของเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งส้ม ได้แก่ OMP1 Stu และ OMP2 Stu สังเคราะห์ ได้ชิ้นของดีเอ็นเอ ขนาด 996 คู่เบส จากนั้นนำไปโคลนเข้าสู่ cloning vector (pTrcHis2-TOPO) และคัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่เชื่อมเข้าไปใน vector นำมาทำให้บริสุทธิ์ แล้วตรวจสอบลำดับเบส พบว่ามีขนาด 996 คู่เบส จากนั้น subclone ยีน *omp* ขนาด 996 คู่เบส เข้าสู่ expression vector pET160/GW/D-TOPO® (Invitrogen) และ transform เข้า *E. coli* Top 10 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1128 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยยีน *omp* ขนาด 996 คู่เบส + Lumio tag 132 คู่เบส คัดเลือกโคลนที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ในเซลล์ของ *E. coli* BL 21 (DES 3) ในอาหาร 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร และใช้สาร Isopropyl-β-D thiogalactopyranoside (IPTG) ในการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน พบว่าระยะเวลาที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้สูงสุด คือ 24 ชั่วโมง โดยให้โปรตีนที่มีขนาดประมาณ 41 กิโลดาลตัน จากนั้นนำไปผ่าน Ni-NTA column แล้วนำโปรตีน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไปฉีดเข้าใต้ผิวหนัง บริเวณคอของกระต่าย โดยผสมกับ Freund's adjuvant ทุก 2 สัปดาห์ รวม 5-6 ครั้ง และเจาะเลือด 6 ครั้ง ผลการตรวจสอบคุณภาพของแอนติซีรัมที่ได้ ด้วยวิธี indirect ELISA โดยเจือจางตั้งแต่ 1:10 ถึง 1:1,000,000 พบว่า แอนติซีรัมจากการเจาะเลือดครั้งที่ 4-6 มีประสิทธิภาพสูงสุด สามารถทำปฏิกิริยาได้จนถึง 1:100,000 จากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมกับตัวอย่างพืชตระกูลส้ม โดยเปรียบเทียบชนิดของ plate พบว่า microwell plate ของ Nunc ให้ปฏิกิริยาดีที่สุด และอัตราใบพืช : coating buffer 1:5 และความเข้มข้นของแอนติซีรัม 1: 500 ให้ผลได้ดี สามารถนำไปปรับใช้ตรวจโรคกรีนนิ่งของพืชตระกูลส้มต่อไปได้

รหัสการทดลอง 09 01 49 02 03 04 02 49

คำนำ

โรคกรีนนิ่ง (greening disease) หรือโรคใบเหลืองต้นโทรม จัดเป็นโรคสำคัญที่ทำความเสียหายให้กับธุรกิจการปลูกส้มของประเทศไทย โดยเนื้อใบมีสีเหลือง แต่เส้นใบยังมีสีเขียวอยู่ ซึ่งคล้ายกับอาการที่เกิดจากการขาดธาตุสังกะสี ผลมีขนาดเล็กและบิดเบี้ยว ถ้าเป็นโรครุนแรงใบมีขนาดเล็ก หนา และต้นทรุดโทรม มีรายงานว่าโรคนี้เกิดจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ แต่ไม่สามารถเลี้ยงหรือเจริญเติบโตในอาหารสังเคราะห์ได้ จัดอยู่ใน alpha subdivision *Proteobacteria* มี 2 สายพันธุ์คือ *Candidatus* Liberibacter asiaticus ซึ่งทนร้อน (heat tolerant strain) มีเพลี้ยไก่แจ้ส้ม (*Diaphorina citri*) เป็นพาหะโดยทั่วไปพบในทวีปเอเชีย และ *Candidatus* Liberibacter africanus เป็นสายพันธุ์ที่ไวต่อความร้อน (heat sensitive strain) และมีเพลี้ยไก่แจ้ (*Trioza erytreaei*) เป็นพาหะแพร่ระบาดในทวีปอัฟริกา (ไมตรี, 2540; Murray and Schleifer, 1994) การตรวจสอบเชื้อสาเหตุของโรคนี้มีหลายวิธี เช่น โดยติดตาทาบกิ่งบนพืชที่อ่อนแอต่อโรค หรือโดยการตรวจหาอนุภาคของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน แต่ต้องใช้เวลาในการตรวจสอบนานนับเดือน ปัจจุบันเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาเป็นที่นิยมใช้ในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุของโรคนี้ เพราะ เป็นวิธีที่แม่นยำ ประหยัด รวดเร็วและสามารถตรวจสอบตัวอย่างพืชได้เป็นจำนวนมาก (Chippindall and Whitlock, 1989; Ohtsu *et al.,* 1995) แต่ไวรัสที่สกัดได้มีปริมาณน้อย ไม่เพียงพอที่จะใช้ในการผลิตแอนติซีรัม ในปัจจุบันอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพทำให้สามารถผลิตโปรตีนต่างๆในเซลล์แบคทีเรียในปริมาณมากได้ และมีความบริสุทธิ์สูง เป็นการเพิ่มปริมาณแอนติเจนเพื่อนำไปผลิตแอนติซีรัมในสัตว์ทดลองต่อไป

แอนติซีรัมของเชื้อสาเหตุ (greening organism, GO) ของโรคกรีนนิ่งส้ม มีรายงานว่าสามารถผลิตจากเส้นกลางใบของส้มหรือแพงพวยที่เป็นโรค เช่น ในประเทศแอฟริกาใต้มีการแยกเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งแบบกึ่งบริสุทธิ์จากส้ม โดยใช้เอนไซม์ช่วยแยก sieve tube ซึ่งมีเชื้อออกจากเนื้อเยื่อส่วนอื่นของพืชและผลิตแอนติซีรัม ซึ่งสามารถใช้ตรวจสอบโรคกรีนนิ่งโดยวิธี ELISA และ immuno-blot assays (Chippindall & Whitlock, 1989) Villechanoux และคณะ (1990) ได้แยกเชื้อ GO (Poona strain) จากแพงพวยที่เป็นโรคโดยใช้วิธี affinity chromatography กับโมโนโคลนอลแอนติบอดี (10A6 strain) และพบอนุภาคของเชื้อสาเหตุทั้งแบบท่อนยาว (1-4 X 0.15-0.3 ไมครอน) และแบบทรงกลมที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.0 ไมครอน แต่ยังไม่มีการนำไปผลิตแอนติซีรัม C.Ke และคณะ (1993) ได้แยกเชื้อ GO จากแพงพวยและผลิตโพลิโคลนอลแอนติบอดี แต่มีคุณภาพต่ำทำให้การวิเคราะห์ผลการตรวจหาเชื้อโดยวิธีทางเซรุ่มวิทยาไม่แม่นยำ Ohtsu และคณะ

(2002) ได้ทดสอบเกี่ยวกับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณเชื้อ GO ในแพงพวย สำหรับนำมาใช้เป็นแหล่งของ GO ในการแยกเชื้อกึ่งบริสุทธิ์ และใช้เอนไซม์ cellulase และ macerozyme ในการแยกเนื้อเยื่อที่มี GO ออกจากเนื้อเยื่อพืชส่วนอื่น แอนติซีรัมที่ผลิตได้สามารถตรวจหาเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งได้แต่ต้องใช้ตัวอย่างพืชในการทดสอบในปริมาณค่อนข้างสูง

Druka และคณะ (1996) รายงานการผลิตแอนติซีรัมจากชิ้นของ coat protein ยีนจากสายพันธุ์ข้าวของประเทศฟิลิปปินส์ โดยนำมาโคลนเข้า vector แล้วนำไปเชื่อมกับ MBP fusion proteinsจากนั้นนำไปฉีดกระตุ้นกระต่ายให้สร้างแอนติบอดี แอนติซีรัมที่ผลิตได้สามารถตรวจวินิจฉัยไวรัสใบสีส้มรูปทรงกลมได้โดยวิธี ELISA, Western blotting และ IEM นอกจากนี้ ลำพึง และคณะ (2547) ได้ทำการสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสเส้นใบเหลืองกระเจี๊ยบเขียวในระบบเซลล์แบคทีเรีย และแยกโปรตีนออกจากเซลล์แบคทีเรีย และนำไปฉีดกระตุ้นกระต่ายทดลองเพื่อผลิตแอนติซีรัมที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรวจเชื้อไวรัสสาเหตุโรค ฉะนั้นควรพัฒนาวิธีการผลิตแอนติซีรัมของ GO โดยอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพ ได้แก่ การเพิ่มปริมาณโปรตีนของเชื้อในเซลล์แบคทีเรีย ก่อนนำไปฉีดเข้ากระต่าย เพราะในปัจจุบันยังไม่มีแอนติซีรัมของ GO ที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับใช้ตรวจสอบโรคกรีนนิ่งของพืชตระกูลส้มในประเทศไทย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

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

วิธีการ

1. การโคลนยีน outer membrane protein (*omp*)

1.1 การออกแบบไพรเมอร์ ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนใน ribosome

ออกแบบไพรเมอร์ จำนวน 7 สาย จากส่วนของยีน outer membrane protein (*omp* gene) ของเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งของประเทศไทย (OMP-TH) ซึ่งเป็น

แบคทีเรียแกรมลบ เพื่อนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอ ในกระบวนการ cloning เข้าสู่ vector

1.2 การแยกสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ

นำตัวอย่างแพงพวยที่ได้รับการปลูกเชื้อสาเหตุของโรค มาแยกสกัดดีเอ็นเอ โดยตัดเฉพาะเส้นกลางใบ นำมาบดในไนโตรเจนเหลวจนละเอียด จากนั้นเติม CTAB buffer ในอัตรา 0.1 กรัม/1มิลลิลิตร บ่มสารละลายใน water bath ที่ 65 °C นาน 10 นาที แล้วนำไปแยกออกจากเนื้อเยื่อพืชด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (15,000 รอบต่อนาที, 10 นาที) ที่ 4 °C จากนั้นเติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ในส่วนน้ำใสที่แยกได้ ในอัตรา 1:1 เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที, 10 นาที นำส่วนของน้ำใสด้านบนของหลอดทดลองมาผสมกับ isopropanol ในอัตรา 1:1 แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอทธานอล 500 ไมโครลิตร นำมาหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ก่อนนำมาทำให้แห้งที่ 37 °C จากนั้นเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 30 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ -20 °C

1.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และการโคลนยีน

นำดีเอ็นเอของเชื้อที่ได้จากการแยกสกัด มาเพิ่มปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ OMP1 Stu (5’ AGG CCT GAA GTT GAT AAG GGT ATG GGC GTA GAA GGG 3’) และ OMP2 Stu (5’ AGG CCT CTA CAT GCG ATT ACC TAT ACG AAA ACC AAA 3’)

โดยใช้ปฏิกิริยาดังนี้

10 X PCR buffer	5.0	ไมโครลิตร
2.5 mM dNTPs	2 .0	ไมโครลิตร
20 uM Primer OMP 1 Stu	1.0	ไมโครลิตร
20 uM Primer OMP 2 Stu	1.0	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase	1.0	ไมโครลิตร
Template	1.0	ไมโครลิตร
dH_2O	38.0	ไมโครลิตร
รวม	50.0	ไมโครลิตร

ทำปฏิกิริยา PCR รวม 32 รอบ ดังนี้

1. 94 °ซ 5 นาที 1 รอบ
2. 94 °ซ 45 วินาที, 65 °ซ 45 วินาที, 72 °ซ 45 วินาที 30 รอบ
3. 72 °ซ 5 นาที 1 รอบ

ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วย 1 % 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 (10-20 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) ที่แยกได้จาก PCR High Pure Column ปริมาตร 0.5-4.0 ไมโครลิตร ผสมกับ โคลนนิ่งเวคเตอร์ pTrcHis2-TOPO (Invitrogen, เป็น cloning & transformation Kits) 1 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ปริมาตรรวม 5 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที จากนั้นดูดมา 3 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดของ One Shot® cell แช่ในน้ำแข็ง นาน 30 นาที แล้วทำการ heat shock cell โดยการแช่หลอดในน้ำที่มีอุณหภูมิ 42°C นาน 30 วินาที ก่อนย้ายไปแช่บนน้ำแข็งทันที เติมอาหาร SOC ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ก่อนนำไปเขย่าที่ 37°C นาน 30 นาที ดูดมา 50 ไมโครลิตร และเทแผ่ลงบนอาหารแข็ง 2XYT Agar (ที่มี ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร) บ่มที่ 37 °C ข้ามคืน

1.5 การสกัดโคลนของพลาสมิด ออกจากเซลล์ของ *E. coli* โดยวิธี Alkaline lysis

คัดเลือกเฉพาะโคโลนีสีขาวบนอาหารแข็ง 2XYT โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ปราศจากเชื้อ แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว 2XYT (มี ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร ผสมอยู่) เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่ 37°ซ ข้ามคืน นำเชื้อที่อยู่ในอาหารเหลว 1 มิลลิลิตร มาหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บตะกอนที่ได้มาละลายใน Solution I (25 mM Tris HCl pH 8.0, 50 mM glucose และ 10 mM EDTA) 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติม Solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS) 200 ไมโครลิตร เขย่าหลอดก่อนที่จะเติม Solution III (3 M potassium acetate pH 5.2) 150 ไมโครลิตร และ chloroform : isoamyl alcohol (24 :1) 150 ไมโครลิตร เขย่าและแช่บนน้ำแข็ง 10 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยง ที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำส่วนของน้ำใสมาเติมด้วย หนึ่งเท่าโดยปริมาตรของ isopropanol และนำไปหมุนเหวี่ยง ที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% ethanol และหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ

และเวลาเท่าเดิม แล้วละลายตะกอนพลาสมิดด้วยน้ำ (มี RNase 2 % ผสมอยู่) 50 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่ 37 °ซ นาน 30 นาที

นำพลาสมิดที่สกัดได้มาตรวจดูขนาดของพลาสมิดและส่วนของยีน *omp* ที่โคลนเข้าไป บน 1% agarose gel electrophoresis จากนั้นนำโคลนมาตัดด้วย เอ็นไซม์ *Eco*R I (1 ยูนิคของ *Eco*RI/ 1ไมโครกรัมของ พลาสมิด) และตรวจสอบซ้ำด้วยเทคนิค PCR ใช้ ไพรเมอร์ OMP1 Stu และ OMP2 Stu ก่อนนำไป sequence เพื่อหาลำดับเบสของ ยีน *omp* ด้วยเครื่อง Sequencer

1.6 การ Subclone ยีน outer membrane protein (*omp*)

หลังจาก subclone ยีน *omp* ขนาด 856 คู่เบส เข้าสู่ pGEX-2T(Amersham) ซึ่งเป็น protein expression vector (ขนาด 4.9 กิโลเบส) ที่ตำแหน่ง *Bam*H I-*Sac* I พบว่ามี 2 โคลนที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ในเซลล์ของ *E. coli* (Rosetta strain) และผลจากการตรวจสอบโดยวิธี SDS-PAGE พบ band ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 59 กิโลดาลตัน แต่เมื่อนำไป purify โปรตีน ปรากฏว่า ได้ปริมาณโปรตีนน้อยมาก จึงได้ทำ subclone ใหม่ โดยนำพลาสมิดที่สกัดได้ (pTrcHis2-TOPO, Invitrogen) มาทำการเพิ่มจำนวนยีนด้วยเทคนิค PCR ใช้ไพรเมอร์ Lumi_OMPF 5’ CA CCGAAGTTGA TAAGGGTATG GGCG 3’ และ Lumi_OMPR 5’ CTACATGC GATTACCTAT ACGAAAACC 3’ และใช้ Deep Vent DNA Polymerase (Proof reading) แทน *Taq* Polymerase เพื่อให้ได้ PCR Product ที่เป็น blunt ends โดยใช้ปฏิกิริยาดังนี้

dNTPs (10 mM)	1.0	ไมโครลิตร
Lumi_OMPF (20 uM)	1.0	ไมโครลิตร
Lumi_OMPR (20 uM)	1.0	ไมโครลิตร
Deep Vent DNA Polymerase	1.0	ไมโครลิตร
Buffer	1.0	ไมโครลิตร
template	1.0	ไมโครลิตร
dH_2O	19.0	ไมโครลิตร
รวม	**25.0**	ไมโครลิตร

นำหลอดที่ผสมปฏิกิริยามาใส่ในเครื่อง Thermal cycler เพื่อสังเคราะห์ DNA ตาม program ดังนี้ ทำปฏิกิริยา PCR รวม 32 รอบ ดังนี้

1. 94 °ซ 5 นาที 1 รอบ
2. 94 °ซ 1 นาที, 58 °ซ 1 นาที, 72 °ซ 1 นาที จำนวน 30 รอบ
3. 72 °ซ 5 นาที 1 รอบ

ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วย 1 % agarose gel electrophoresis ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวล์ท ใน TAE บัฟเฟอร์ เป็นเวลา 30 นาที

นำ PCR product นำมาเชื่อมต่อ (ligation) เข้าสู่ expression vector pET160/GW/D-TOPO® (Invitrogen) และถ่ายเข้าสู่ (transformation)เข้า *E. coli* Top 10 โดยใช้ $CaCl_2$ ที่ 42°C นาน 90 วินาที และแช่บนน้ำแข็งทันที นาน 3 นาที จากนั้นทำการคัดเลือกโคลนบนอาหาร 2XYT ที่มี ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร ผสมอยู่ (ขั้นตอนเหมือนข้อ 1.5) ตรวจสอบโคลนด้วยเทคนิค PCR และส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อตรวจสอบความถูกต้อง จากนั้น transform เข้า competent cell ของ *E. coli* BL21 (DES 3) โดยใช้ $CaCl_2$ ที่ 42°C นาน 90 วินาที และแช่บนน้ำแข็งทันที นาน 3 นาที คัดเลือกโคโลนีของพลาสมิดบนอาหาร 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อนำไปสังเคราะห์โปรตีนในขั้นตอนต่อไป

2. การวิเคราะห์ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการชักนำการสังเคราะห์ recombinant proteinในเซลล์แบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DES 3) ที่มีพลาสมิดสายผสม pET160/GW/D-TOPO® - *omp* ในอาหารเหลว 2XYT 100 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร เขย่า 170 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็น starter จากนั้นแบ่งใส่ในอาหารเหลว 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร ในอัตราส่วนของเชื้อ 10 % ของอาหาร เขย่าต่ออีก 2 ชั่วโมง จากนั้นเติม Isopropyl-β-D thiogalactopyranoside (IPTG) ในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงเชื้อต่อโดยการเขย่าบนเครื่อง shaker และเก็บตัวอย่างเซลล์หลังการเติม IPTG ที่ 2 4 6 และ 24 ชั่วโมง ครั้งละ 1 มิลลิลิตร นำมาปั่นตกตะกอน ที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 50 ไมโครลิตร และเก็บไว้ที่ -20 °ซ จากนั้นแล้วเติม 2xSDS-PAGE sample buffer (0.125 Tris-HCl pH 6.8, 20% glycerol, 4% SDS, 0.02% bromophenol blue R250, 5% β-Mercaptoethanol)

50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปต้มในน้ำเดือด นาน 10 นาที แล้วนำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

3. การแยกโปรตีนของเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column

นำแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DES 3) ที่มีพลาสมิดสายผสม pET160/GW/D-TOPO® - *omp* หลังจากลี้ยงในอาหารเหลว 2XYT ที่เวลาอันเหมาะสมในการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน มาปั่นตกตะกอนที่ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที (4°ซ) นำตะกอนมาผสมกับน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (ตะกอน 1 กรัม/น้ำ 10 มิลลิลิตร) จากนั้นเติม lysozyme เพียงเล็กน้อยประมาณเท่าหัวไม้ขีดไฟ (ต่ออาหารเหลว 1 ลิตร) และกวนให้เข้ากันจนเหนียว เก็บที่ -20 °ซ 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 นาน 10 นาที (4 °ซ) 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 เพื่อนำไปตรวจสอบขนาดของโปรตีนว่าอยู่ใน fraction ใด โดยเทคนิค SDS-PAGE และคำนวนปริมาณโปรตีนที่ผ่าน column โดยใช้สูตรของ Bradford's

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 สำหรับการฉีดครั้งต่อๆไปอีก 4 ครั้ง การฉีดทุกครั้งเป็นการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) บริเวณคอ ประมาณ 4-5 จุดต่อการฉีดแต่ละครั้ง ทำการฉีดทุก 2 สัปดาห์ เริ่มทำการเจาะเลือดที่เส้นเลือดบริเวณใบหู หลังจากการฉีดครั้งที่ 2 และดำเนินการเจาะเลือดทุก 1สัปดาห์อีก 5 ครั้ง นำเลือดที่เจาะได้มาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปเก็บที่ 4 °C อีก 24 ชั่วโมง รินส่วนน้ำใสมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 g นาน 10 นาที เก็บน้ำใสที่เป็นส่วนของแอนติบอดีไว้ที่ -80 °ซ จากนั้นทำการทดสอบและหาค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัม โดยวิธี Indirect ELISA เริ่มจากการหยอด

แอนติเจน (recombinant protein 1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 °ซ 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 °ซ นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างอีก 3 ครั้ง ใส่แอนติบอดีที่ได้จากการเจาะเลือดกระต่าย 6 ครั้ง โดยทำการเจือจางจาก 1: 10 ถึง 1:1,000,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลทอีก 3 ครั้งก่อนนำมาหยอดด้วย Goat anti-rabbit IgG ที่ติดฉลากด้วย alkaline phosphatase เจือจาง 1:2000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°ซ นาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลทอีก 3 ครั้งก่อนนำมาซับสเตรท p-nitrophenyl phosphstase หลุมละ 100 ไมโครลิตร อ่านผลด้วยเครื่องอ่าน ELISA ทีค่าความดูดกลืนแสง 405 นาโนเมตร

5. การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตได้

การตรวจสอบโรคกรีนนิ่งของพืชตระกูลส้ม โดยวิธี Indirect ELISA เริ่มจากนำเส้นกลางใบของส้มที่เป็นโนโรคกรีนนิ่งและส้มปกติ มาบดใน coating buffer ในอัตรา 1 กรัม : 5, 10 , 15 มิลลิลิตร หยอดน้ำคั้นพืชลงในหลุมของไมโครเพลท (microplate) 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 °ซ นาน 1-2 ชั่วโมง แล้วนำไมโครเพลทมาล้างด้วย phosphate buffer saline ที่มี tween 20 ผสมอยู่ (PBS-Tween 20) 3 ครั้งๆละ 3 นาที หยอดแอนติซีรัมจากการเลือดครั้งที่ 5 ที่เจือจางใน conjugate buffer 1: 500 และ 1 : 1,000 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง ล้างไมโครเพลทด้วย PBS-Tween 20 จำนวน 3 ครั้งๆละ 3 นาที แล้วหยอด Goat-Anti Rabbit อัตรา 1: 2,000 ใน conjugate buffer 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 °ซ 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) โดยมีการเปรียบเทียบชนิดของเพลท 2 ชนิด ได้แก่ microplate ของ Nunc และ ELI/RIA Plate ขอ งCostar

เวลาและสถานที่ ระยะเวลา ตุลาคม 2548 - กันยายน 2552
สถานที่ กลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การโคลนยีน outer membrane protein (*omp*)

ไพรเมอร์ จำนวน 7 สาย ที่ออกแบบจากส่วนของยีน outer membrane protein (*omp* gene) ของเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งของประเทศไทย (OMP-TH) (ภาพที่ 1) เพื่อนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอ ในกระบวนการ cloning เข้าสู่ vector ได้แก่

OMP1 Stu (5' AGG CCT GAA GTT GAT AAG GGT ATG GGC GTA GAA GGG 3')

OMP2 Stu (5' AGG CCT CTA CAT GCG ATT ACC TAT ACG AAA ACC AAA 3')

OMP3N (5' GGATCCTATTTTTTAGGGAGTCCTA 3')

OMP4N (5' GAGCTCATAATTCGAACTCACTGAG 3'

OMP6C (5' GAGCTCCATGCGATTACCTATACGA 3')

OMP7Strep (5' ATGGTAGGTCTCAGCGCCTATTTTTTAGGGAGTCCTATATCCG 3')

OMP8Strep (5' ATGGTAGGTCTCATATCACATGCGATTACCTATACGAAAACC 3')

การเลือกยีน *omp* เพื่อใช้ในการโคลนเข้าสู่พลาสมิดเวคเตอร์ (cloning nvector และ protein expression vectors) สำหรับผลิตและเพิ่มปริมาณโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งจะนำไปใช้เป็นแอนติเจนในการผลิตแอนติซีรัมในสัตว์ทดลอง เพราะเป็นยีนที่อยู่บนเนื้อเยื่อชั้นนอกสุดของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับสิ่งแวดล้อมภายนอกและความสามารถในการเกิดโรค (Bastianel *et al*., 2005)

ปริมาณดีเอ็นเอ ของใบแพงพวยที่เป็นโรคและใบปกติที่ได้จากการสกัด และเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ใช้ไพรเมอร์ OMP1 Stu และ OMP1 Stu จากการตรวจวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอ ด้วย agarose gel electrophoresis พบ แถบดีเอ็นเอขนาด 996 คู่เบส (bp) ในใบพืชที่เป็นโรค (ภาพที่ 2)

การตรวจสอบว่าโคลนต่างๆของพลาสมิด pTrcHis2-TOPO หลังต่อเชื่อมกับ PCR product (996 คู่เบส) และtransform เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* (DH 5α) และนำโคลนที่มีดีเอ็นเอขนาด 996 คู่เบส ไปตรวจหาลำดับเบสของยีน *omp* ด้วยเครื่อง Sequencer พบว่าเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *omp* (ภาพที่ 3)

- ผลการ Subclone ยีน outer membrane protein (*omp*) หลังจาก subclone ยีน *omp* ขนาด 996 คู่เบส เข้าสู่ expression vector pET160/GW/D-TOPO® (Invitrogen) ซึ่งเป็น protein expression vector (ขนาด 5.8 กิโลเบส) (ภาพที่ 4) และ transform เข้า *E. coli* Top 10 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1128 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยยีน *omp* ขนาด 996 คู่เบส + Lumio tag 132 คู่เบส (ภาพที่ 5) จากนั้นคัดเลือกโคลนที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ในเซลล์ของ *E. coli* BL 21 (DES 3) ในอาหาร 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ

ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร และใช้สาร Isopropyl-β-D thiogalactopyranoside (IPTG) ในการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน

2. การวิเคราะห์ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการชักนำการสังเคราะห์ recombinant proteinในเซลล์แบคทีเรีย

หลังจากการเติมสาร IPTG เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการแสดงออกของยีน จากนั้นทำการเก็บเซลล์ที่ 2 4 6 และ 24 ชั่วโมง เมื่อนำมาตรวจหาระยะเวลาที่เริ่มมีการสังเคราะห์โปรตีนตั้งแต่ 4 ชั่วโมง และพบมากที่สุดเมื่อปล่อยให้เกิดการชักนำข้ามคืน โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE พบ band ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 41 กิโลดาลตัน ซึ่งมีค่าเท่ากับปริมาณโปรตีนที่คำนวณได้ พลาสมิดสายผสม (41.3 กิโลดาลตัน) (ภาพที่ 6)

3. การแยกโปรตีนของเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column

จากการตรวจปริมาณโปรตีนทีหลังการแยกให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ปรากฏว่า เริ่มพบ band ขนาด 41 กิโลดาลตันตั้งแต่ fraction ที่ 3-13 (F3-F13) แต่มีปริมาณโปรตีนสูงตั้งแต่ F7-F10จึงเก็บน้ำใสของ F4-F11 มารวมกัน และจากการคำนวนหาปริมาณโปรตีนที่สังเคราะห์ได้ พบว่ามีปริมาณ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งนำไปผสมกับ Freund's adjuvant ครั้งละ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

4. การผลิตแอนติซีรัมในสัตว์ทดลอง

ดำเนินการฉีดกระต่าย จำนวน 5-6 ครั้ง และเจาะเลือดครั้งละประมาณ 30-40 มิลลิลิตร เพื่อนำไปปั่น และเก็บน้ำใส ได้แอนติบอดีครั้งละ 10-15 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -80°ซ ผลการตรวจสอบคุณภาพของแอนติซีรัมที่ได้จากการเจาะเลือด จำนวน 6 ครั้ง โดยวิธี indirect ELISA โดยทำการเจือจางแอนติซีรัมจาก 1:10 ถึง 1:1,000,000 พบว่า แอนติซีรัมจากการเจาะเลือดครั้งที่ 4-6 มีประสิทธิภาพสูงสุด สามารถทำปฏิกิริยาได้จนถึง 1:100,000

5. การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตได้

จากการทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมกับตัวอย่างพืชตระกูลส้ม โดยเปรียบเทียบชนิดของ plate พบว่า microwell plate ของ Nunc ให้ปฏิกิริยาดีกว่า ELI/RIA Plate ของ Costar ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นสีเหลืองทุกหลุม ทำให้ไม่สามารถอ่านผลความแตกต่างระหว่างส้มเป็นโรคและส้มปกติได้ จากการตรวจสอบประสิทธิภาพในการ

ตรวจสอบโรคกรีนนิ่งของพืชตระกูลส้ม พบว่าอัตราใบพืช : coating buffer 1:5 และความเข้มข้นของแอนติซีรัม 1: 500 ให้ผลได้ดีกว่า อัตราใบพืช : coating buffer 1:10 และ 1:15 และ ความเข้มข้นของแอนติซีรัม 1: 1000

สรุปผลการทดลองและข้อแนะนำ

ใช้เส้นกลางใบของแพงพวยที่เป็นโรคกรีนนิ่ง มาแยกสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ CTAB buffer ในการบดตัวอย่าง แล้วนำไปเพิ่มปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์จากส่วนของยีน outer membrane protein ของเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งส้ม ได้แก่ OMP1 Stu และ OMP2 Stu สังเคราะห์ ได้ชิ้นของดีเอ็นเอ ขนาด 996 คู่เบส จากนั้นนำไปโคลนเข้าสู่ cloning vector (pTrcHis2-TOPO) และคัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปใน vector นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี หลังจากนั้นใช้ไพรเมอร์ OMP3N และ OMP6C เพิ่มปริมาณ OMP โปรตีนจาก pTrc-996-OMP ซึ่งสังเคราะห์ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 856 คู่เบส และจากการ subclone ยีน *omp* ขนาด 996 คู่เบส เข้าสู่ expression vector pET160/GW/D-TOPO® (Invitrogen) ซึ่งเป็น protein expression vector (ขนาด 5.8 กิโลเบส) และ transform เข้า *E. coli* Top 10 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1128 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยยีน *omp* ขนาด 996 คู่เบส + Lumio tag 132 คู่เบส จากนั้นคัดเลือกโคลนที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ในเซลล์ของ *E. coli* BL 21 (DES 3) ในอาหาร 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร และใช้สาร Isopropyl-β-D thiogalactopyranoside (IPTG) ในการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน พบว่าระยะเวลาที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้สูงสุด คือ 24 ชั่วโมง โดยให้โปรตีนที่มีขนาดประมาณ 41 กิโลดาลตัน จากนั้นนำไปผ่าน Ni-NTA column ได้โปรตีนที่มีขนาด 41 กิโลดาลตัน ใน fraction ที่ 3-13 และมีปริมาณ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ได้จากการคำนวณโดยใช้สูตร Bradford แล้วนำโปรตีน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไปฉีดเข้าใต้ผิวหนัง บริเวณคอของกระต่าย โดยผสมกับ Freund's adjuvant ทุก 2 สัปดาห์ รวม 5-6 ครั้ง และเจาะเลือดเพื่อแยกแอนติบอดีออกมาจากเม็ดเลือดแดง ทดสอบไตเตอร์ของแอนติบอดีจากการเจาะเลือดแต่ละครั้ง พบว่า แอนติซีรัมที่เจาะครั้งที่4-6 มีไตเตอร์สูงสุด คือ พบว่า แอนติซีรัมจากการเจาะเลือดครั้งที่ 4-6 มีประสิทธิภาพสูงสุด สามารถทำปฏิกิริยาได้จนถึง 1:100,000 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมกับตัวอย่างพืชตระกูลส้ม พบว่า microwell plate ของ Nunc ให้ปฏิกิริยาดีที่สุด และอัตราใบพืช : coating buffer 1:5 และความเข้มข้นของแอนติซีรัม 1: 500 ให้ผลได้ดี สามารถนำไปปรับใช้ตรวจโรคกรีนนิ่งของพืชตระกูลส้มต่อไปได้

เอกสารอ้างอิง

ไมตรี พรหมมินทร์. 2540. โรคไวรัสและโรคคล้ายไวรัสของส้ม เอกสารวิทยาการส้มทางเลือกปัจจุบันสู่อนาคต สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ร่วมกับศูนย์วิจัยและพัฒนาไม้ผลเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 7-11 กรกฎาคม 2540 ณ โรงแรมมารวย การ์เด้น กรุงเทพฯ 16 หน้า.

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

Bastianel, C., M. Garnier-Semancik, J. Renaudin, J.M. Bove and S. Eveillard. 2005. Diversity of "*Candidatus* Liberibacter asiaticus," Based on the *omp* gene sequence. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 6473-6478.

Chippindall, R.J. and V.H. Whitlock. 1989. Development of an antiserum to detect greening disease of citrus. *Phytopath.* 79 : 1212 (Abstr.).

Druka, A., Burns, T., Zhang, S. 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.

Ke, C., Ke, S., Wu, R.J., Yang, H. and P.T. Hsu. 1993. Purification and serology of the organism associated with citrus Huanglongbing. *In* Proc. 12th Conf. Int. Organ. Citrus Virol., pp. 220-223, University of California, Riverside.

Laemmli, E.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T 4. *Nature.* 227: 680-685.

Murray, R.G.E. and K.H. Schleifer. 1994. Taxonomic notera proposal for recording the properties of pulative taxa of prokaryotes. *J. Sys. Bacteriol.* 44: 174-176.

Ohtsu, Y., Prommintara, M., Kawashima, K., Okuda, S., Goto, T., Yamamoto, M., Kiratiya-angul, S., Choopanya, D. and T. Kano. 1995. Development of methods for the diagnosis and control of citrus greening disease in Thailand. Final report under the cooperation research program between Thailand and Japan. 63 p.

Ohtsu, Y., Prommintara, M., Okuda, S., Goto, T., Kano, T. Nakashima, K., Koiszumi, M. Imada, J. and K. Kawashima. 2002. Partial purification of Thai isolate of citrus huanglongbing (greening) bacterium and antiserum production for serological diagnosis. J. Gen. Plant Pathol. 68 : 372-377.

Villechanoux, S., Garnier, M. and J.M. Bove. 1990. Purification of bacterium-like organism associated with greening disease of citrus by immunoaffinity chromatography and monoclonal antibodies. Curr. Microbiol. 21 : 175-180.

AGGCCT GAAGTTGATA AGGGTATGGG CGTAGAAGGG-> (OMP1Stu)

1 GAAGTTGATA AGGGTATGGG CGTAGAAGGG CATATTGAGG ATAATAACCT TTTTGGTCAG

CTTCAACTAT TCCCATACCC GCATCTTCCC GTATAACTCC TATTATTGGA AAAACCAGTC

61 GGGTATAGAG CTCGTTTAGC GGCAGGGGTT GGACGTCATG CAGTACAAAA CTATACTTTT

CCCATATCTC GAGCAAATCG CCGTCCCCAA CCTGCAGTAC GTCATGTTTT GATATGAAAA

ATG GTA GGT CTC Agc gcC TAT TTT TTA GGG AGT CCT ATA TCC GCG→ (OMP7 Strep)

GGATCCTATTT TTTAGGGAGT CCTA→(OMP3N)

121 AGTGTTGAGG ATCCATATTT TTTAGGGAGT CCTATATCCG CGGGTTTTGA TCTCCAAAAA

TCACAACTCC TAGGTATAAA AAATCCCTCA GGATATAGGC GCCCAAAACT AGAGGTTTTT

181 ACCCATCTTG AAGATGGCTC TCTTGACATA AATGATGAAT CTGCTGCTGT ACGTATGATA

TGGGTAGAAC TTCTACCGAG AGAACTGTAT TTACTACTTA GACGACGACA TGCATACTAT

241 GTTCCTATTA CTGAAAGCAT ATCGACAAGT TTTAAGTATG ATCTTAGGTT TTTACAATAT

CAAGGATAAT GACTTTCGTA TAGCTGTTCA AAATTCATAC TAGAATCCAA AAATGTTATA

301 GGTGCTGTAT CAGAAAAAGA AAAGATCCCT TCGATATATA CAACGTTAAT AGAACATGGA

CCACGACATA GTCTTTTTCT TTTCTAGGGA AGCTATATAT GTTGCAATTA TCTTGTACCT

361 AAATTCAGCA GCCATTCAAC TTCCCAAAGT ATCATCTATA ATACACTAGA TAACCCAATT

TTTAAGTCGT CGGTAAGTTG AAGGGTTTCA TAGTAGATAT TATGTGATCT ATTGGGTTAA

421 GTGCCACGTA AAGGCATGTT GATATCATCT TCTTATGATT ATGCAGGTTT TGGAGGAGAT

CACGGTGCAT TTCCGTACAA CTATAGTAGA AGAATACTAA TACGTCCAAA ACCTCCTCTA

GGATCCGAG TCACTCAAGC TTAATA→ (OMP5C)

481 TCTCAATATC ATCGGATTGG ATCTCGAGCA TCGTATTTTT ATCTTCTATC AGATGATTCT

AGAGTTATAG TAGCCTAACC TAGAGCTCGT AGCATAAAAA TAGAAGATAG TCTACTAAGA

541 GATATTGTCG GTTCTTTACG ATTTGGATAT GGATGTGTCA TTCCTAGCAA TAAAAATTTG

CTATAACAGC CAAGAAATGC TAAACCTATA CCTACACAGT AAGGATCGTT ATTTTTAAAC

601 CAATTGTTTG ATCAGTTCTC AGTGAGTTCG AATTATTATC TGAGGGGATT TGCATATAAG

GTTAACAAAC TAGTCAAGAG TCACTCAAGC TTAATAATAG ACTCCCCTAA ACGTATATTC

←GAG TCACTCAAGC TTAATACTCGAG (OMP4N)

661 GGTATAGGTC CGCGTGTGGA TAAGAAATAT GCGATTGGAG GTAAGATTTA TTCGTCTGCA

CCATATCCAG GCGCACACCT ATTCTTTATA CGCTAACCTC CATTCTAAAT AAGCAGACGT

721 AGTGCAGCAG TGAGTTTTCC CATGCCTCTT GTTCCTGAAA GGGCTGGTTT GCGTGGTGCT

TCACGTCGTC ACTCAAAAGG GTACGGAGAA CAAGGACTTT CCCGACCAAA CGCACCACGA

781 TTTTTTGTTG ATTCTGCGAC TCTTTATGCA AATCATGTTG CTCTCGGTGC CGATAAGCTG

AAAAAACAAC TAAGACGCTG AGAAATACGT TTAGTACAAC GAGAGCCACG GCTATTCGAC

841 GAAGGGAATG ATTCTTTCTG GCGTGTTTCT ACTGGAGTAG AAATAATGTG GAATTCTCCA

CTTCCCTTAC TAAGAAAGAC CGCACAAAGA TGACCTCATC TTTATTACAC CTTAAGAGGT

901 CTCGGGATGA TGGGTGTCTA TTATGGTATA CCATTGCGTC ACCGAGAGGG TGATAAAATT

GAGCCCTACT ACCCACAGAT AATACCATAT GGTAACGCAG TGGCTCTCCC ACTATTTTAA

961 CAGCAGTTTG GTTTTCGTAT AGGTAATCGC ATGTAG

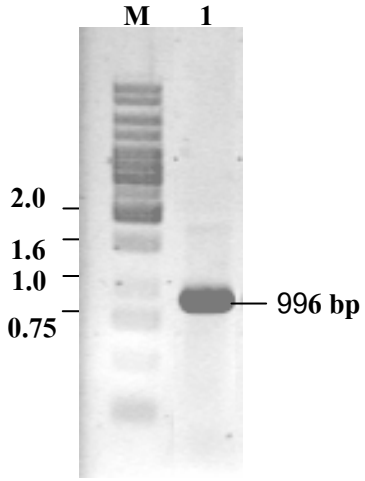
GTCGTCAAAC CAAAAGCATA TCCATTAGCG TTCATC

← AAAC CAAAAGCTTT CCATTAGCGTACATC TCCGGA (OMP2Stu)

←C CAAAAGCATA TCCATTAGCG TACAct atACTC TGGATGGTA (OMP8 Strep)

←GAG TCACTCAAGC TTAATACTCGAG (OMP6C)

ภาพที่ 1. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *omp* ของเชื้อ *Candidatus* Liberibacter asiaticus สาเหตุโรคกรีนนิ่งส้ม และ ไพร เมอร์ที่ออกแบบบนยีน omp

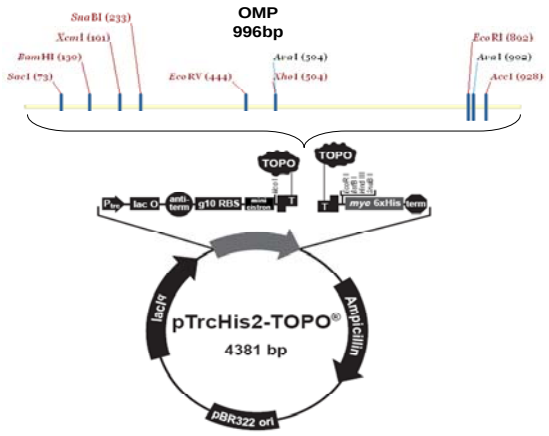


ภาพที่ 2. การเพิ่มปริมาณยีน *omp* โดยใช้ไพรเมอร์ OMP1 Stu และ OMP2 Stu วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis

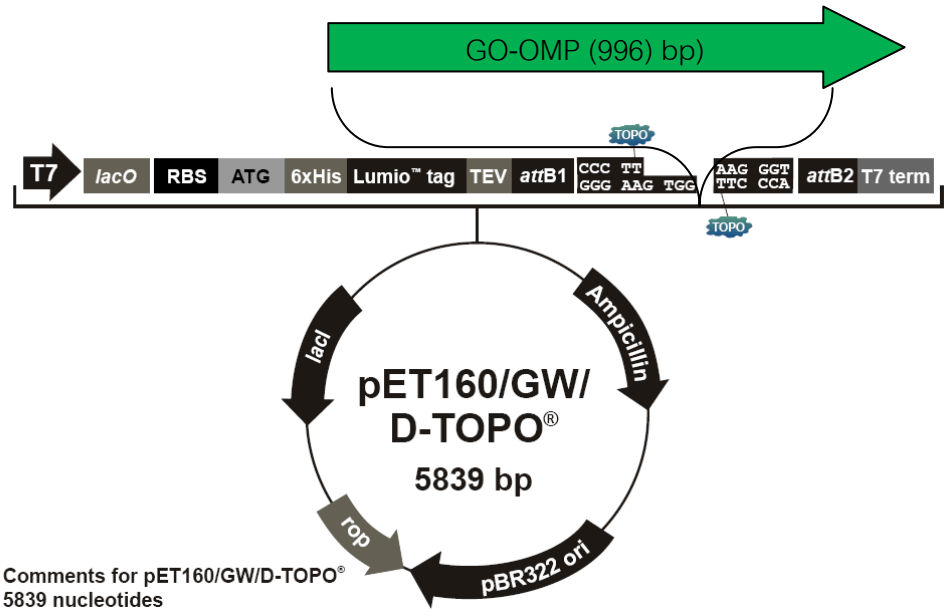
M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb Ladder, Fermentas)

1 = ดีเอ็นเอของยีน *omp* จากแพงพวยที่เป็นโรคกรีนนิ่ง

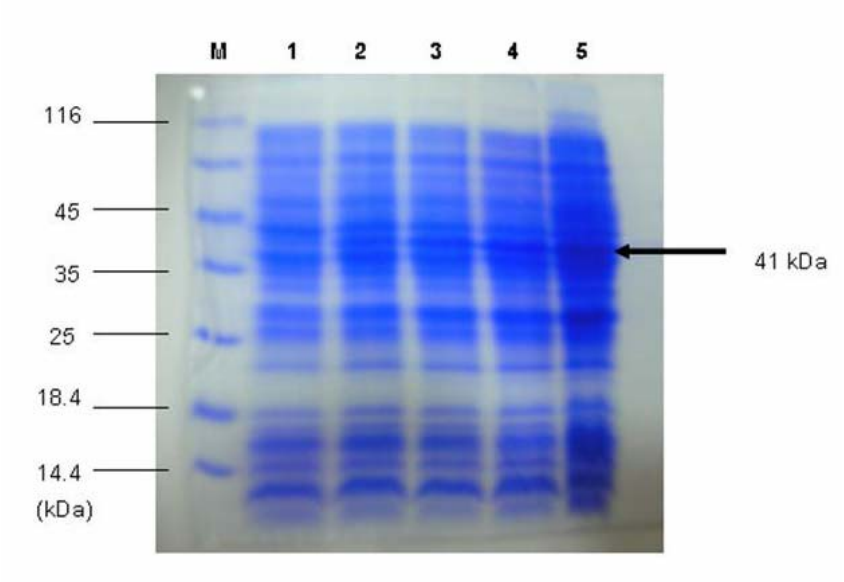
```
      E V D K G M G V E G H I E D N N L F G Q
1     GAAGTTGATAAGGGTATGGGCGTAGAAGGGCATATTGAGGATAATAACCTTTTTGGTCAG
      G Y R A R L A A G V G R H A V Q N Y T F
61    GGGTATAGAGCTCGTTTAGCGGCAGGGGTTGGACGTCATGCAGTACAAAACTATACTTTT
      S V E D P Y F L G S P I S A G F D L Q K
121   AGTGTTGAGGATCCATATTTTTTAGGGAGTCCTATATCCGCGGGTTTTGATCTCCAAAAA
      T H L E D G S L D I N D E S A A V R M I
181   ACCCATCTTGAAGATGGCTCTCTTGACATAAATGATGAATCTGCTGCTGTACGTATGATA
      V P I T E S I S T S F K Y D L R F L Q Y
241   GTTCCTATTACTGAAAGCATATCGACAAGTTTTAAGTATGATCTTAGGTTTTTACAATAT
      G A V S E K E K I P S I Y T T L I E H G
301   GGTGCTGTATCAGAAAAAGAAAAGATCCCTTCGATATATACAACGTTAATAGAACATGGA
      K F S S H S T S Q S I I Y N T L D N P I
361   AAATTCAGCAGCCATTCAACTTCCCAAAGTATCATCTATAATACACTAGATAACCCAATT
      V P R K G M L I S S S Y D Y A G F G G D
421   GTGCCACGTAAAGGCATGTTGATATCATCTTCTTATGATTATGCAGGTTTTGGAGGAGAT
      S Q Y H R I G S R A S Y F Y L L S D D S
481   TCTCAATATCATCGGATTGGATCTCGAGCATCGTATTTTTATCTTCTATCAGATGATTCT
      D I V G S L R F G Y G C V I P S N K N L
541   GATATTGTCGGTTCTTTACGATTTGGATATGGATGTGTCATTCCTAGCAATAAAAATTTG
      Q L F D Q F S V S S N Y Y L R G F A Y K
601   CAATTGTTTGATCAGTTCTCAGTGAGTTCGAATTATTATCTGAGGGGATTTGCATATAAG
      G I G P R V D K K Y A I G G K I Y S S A
661   GGTATAGGTCCGCGTGTGGATAAGAAATATGCGATTGGAGGTAAGATTTATTCGTCTGCA
      S A A V S F P M P L V P E R A G L R G A
721   AGTGCAGCAGTGAGTTTTCCCATGCCTCTTGTTCCTGAAAGGGCTGGTTTGCGTGGTGCT
      F F V D S A T L Y A N H V A L G A D K L
781   TTTTTTGTTGATTCTGCGACTCTTTATGCAAATCATGTTGCTCTCGGTGCCGATAAGCTG
      E G N D S F W R V S T G V E I M W N S P
841   GAAGGGAATGATTCTTTCTGGCGTGTTTCTACTGGAGTAGAAATAATGTGGAATTCTCCA
      L G M M G V Y Y G I P L R H R E G D K I
901   CTCGGGATGATGGGTGTCTATTATGGTATACCATTGCGTCACCGAGAGGGTGATAAAATT
      Q Q F G F R I G N R M *
961   CAGCAGTTTGGTTTTCGTATAGGTAATCGCATGTAG
```



ภาพที่ 3. ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *omp* (996 bp) ที่ transform เข้าสู่ พลาสมิด pTrcHis2-TOPO



ภาพที่ 4. subcloning ยีน *OMP* ขนาด 996 คู่เบส เข้าสู่ expression vector pET160/GW/D-TOPO® (Invitrogen)

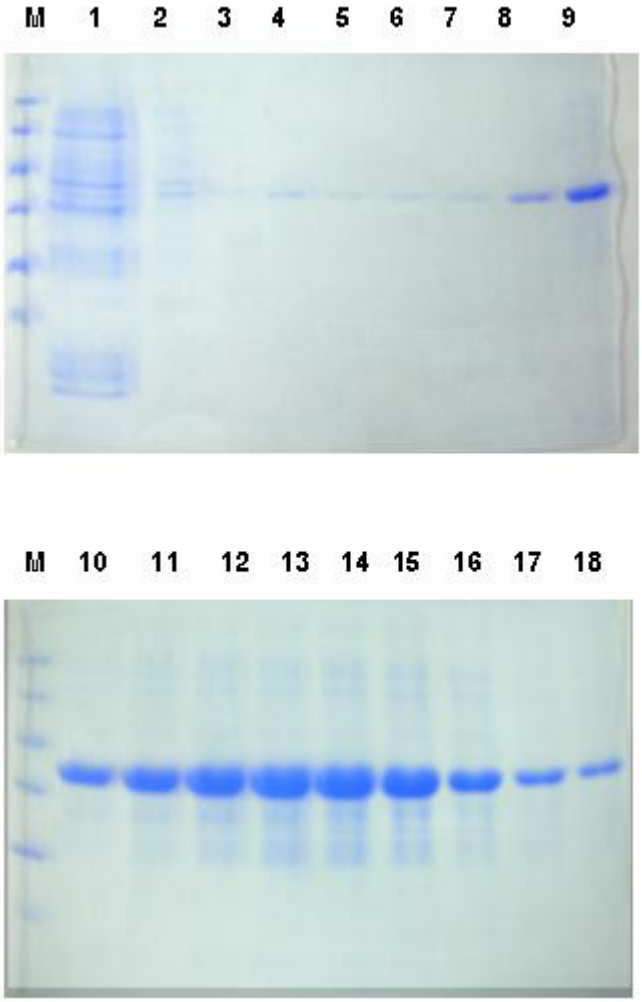


ภาพที่ 5 ผลการชักนำให้สร้างโปรตีนในพลาสมิดสายผสม pET 160/GW/D-TOPO®-*omp* ด้วยสาร IPTG ที่ระยะเวลาต่างๆกัน ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

M : โปรตีนมาตรฐาน (Fermentas)

1 : โปรตีนที่แยกได้ก่อนการชักนำด้วย IPTG

2-5 : โปรตีนที่แยกได้หลังการชักนำ 2 4 6 และ 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 6 ปริมาณโปรตีนที่สังเคราะห์ได้หลังจากผ่าน Ni-NTA column ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

M : โปรตีนมาตรฐาน (Fermentas)

1-5 : โปรตีนที่แยกได้หลังจากล้าง column ด้วย washing buffer

6-18 : โปรตีนที่แยกได้ในแต่ละ fraction ตั้งแต่ 1-13 หลังการใช้ eluting buffer