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

Antiserum Production of *Pineapple mealybug wilt-associated virus*-1 Causing Pineapple Wilt Disease by Bacterial Cell System

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

[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2/]ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บทคัดย่อ

การผลิตแอนติซีรัมโดยใช้ระบบเซลล์แบคทีเรีย เริ่มจากนำใบสับปะรดที่เป็นโรคเหี่ยวมาแยกสกัดอาร์เอ็นเอ แล้วนำไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคอณูชีววิทยา โดยใช้ไพรเมอร์จากส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส PMWaV-1 ได้แก่ pet101_PMWaV1F (5'CACCATGGCTGA TTCGAGCAAACAAAAACAAC3') และ pet101_PMWaV1R (5'TTTGCGTCCACCCATAAAGAT GTGCG3') สังเคราะห์ ได้ชิ้นของดีเอ็นเอ ขนาด 771 คู่เบส จากนั้นนำไปโคลนเข้าสู่เวคเตอร์ pET 101/D-TOPO® (Invitrogen) และคัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปในพาหะ นำมาทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นคัดเลือกโคลนที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ในเซลล์ของแบคทีเรีย *E. coli* BL 21 (DES 3) ในอาหารสูตร 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และใช้สารไอพีทีจีในการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน พบว่าระยะเวลาที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้สูงสุด คือ 24 ชั่วโมง โดยให้โปรตีนที่มีขนาดประมาณ 28 กิโลดาลตัน ทำการแยกโปรตีนของเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column เพื่อนำไปผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีในกระต่าย ผลการตรวจสอบคุณภาพของแอนติซีรัมที่ได้ ด้วยวิธี indirect ELISA พบว่า แอนติซีรัมจากการเจาะเลือดครั้งที่ 5-7 มีประสิทธิภาพสูงสุด สามารถทำปฏิกิริยาได้ถึง 1:10,000 จากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมกับตัวอย่างสับปะรดที่แสดงอาการเหี่ยว โดยเปรียบเทียบชนิดของเพลท พบว่า โพลีซอฟท์ เพลท ของ Nunc ให้ปฏิกิริยาดีที่สุด แต่ให้ปฏิกิริยาค่อนข้างต่ำ ทำให้อ่านผลยาก แอนติซีรัมที่ผลิตได้อาจเหมาะนำไปใช้ในการตรวจหาไวรัสโดยวิธี Immunosorbent electron microscopy (IEM)

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) ได้ทำการสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส

เส้นใบเหลืองกระเจี๊ยบเขียวในระบบเซลล์แบคทีเรีย 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

50 ul. Reaction

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) แช่ในน้ำแข็งนาน 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

คัดเลือกโคโลนีสีขาวบนอาหารแข็ง 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 นำส่วนของน้ำใสมาเติมด้วยหนึ่งเท่าโดยปริมาตรของ 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 แล้วจึงนำพลาสมิดที่สกัดได้ส่งตรวจเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ไพรเมอร์ T7F และ T7R เพื่อตรวจสอบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีการกลับทิศหรือไม่

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 pET 101/D-TOPO®-*cp* 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 8 และ 24 ชั่วโมง ครั้งละ 1 มิลลิลิตร นำมาปั่นตกตะกอนที่ 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® - *cp* 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 และคำนวณปริมาณโปรตีนที่ผ่าน 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 1 สัปดาห์อีก 6 ครั้ง นำเลือดที่เจาะได้มาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปเก็บที่ 4 °ซ อีก 24 ชั่วโมง รินส่วนน้ำใสมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 g นาน 10 นาที เก็บน้ำใสที่เป็นส่วนของแอนติบอดีไว้ที่ -80 °ซ จากนั้นทำการทดสอบและหาค่าไทเทอร์ (titer) ของแอนติซีรัม โดยวิธี Indirect ELISA เริ่มจากการหยอดแอนติเจน (recombinant protein 10 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

การตรวจสอบโรคเหี่ยวของสับปะรด โดยวิธี Indirect ELISA เริ่มจากนำโคนใบที่มีสีขาวของสับปะรดที่เป็นโรคและใบปกติ 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: 100 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 polysorp microplate ของ Nunc และ ELI/RIA Plate ขอ งCostar

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) (รูปที่ 1)

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

2. การวิเคราะห์ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการชักนำการสังเคราะห์ recombinant proteinในเซลล์แบคทีเรีย

หลังจากการเติมสาร IPTG เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการแสดงออกของยีน จากนั้นทำการเก็บเซลล์ที่ 2 4 6 8 และ 24 ชั่วโมง เมื่อนำมาตรวจหาระยะเวลาที่เริ่มมีการสังเคราะห์โปรตีนตั้งแต่ 4 ชั่วโมง และพบมากที่สุดเมื่อปล่อยให้เกิดการชักนำข้ามคืน โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE พบ band ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 28 กิโลดาลตัน (รูปที่ 3)

3. การแยกโปรตีนของเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column

จากการตรวจปริมาณโปรตีนทีหลังการแยกให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ปรากฏว่า เริ่มพบ band ขนาด 28 กิโลดาลตัน ตั้งแต่ fraction ที่ 2-13 (F2-F13) แต่มีปริมาณโปรตีนสูงตั้งแต่ F3-F6 และจากการคำนวณหาปริมาณโปรตีนที่สังเคราะห์ได้ พบว่ามีปริมาณ 1.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งนำไปผสมกับ Freund's adjuvant ครั้งละ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

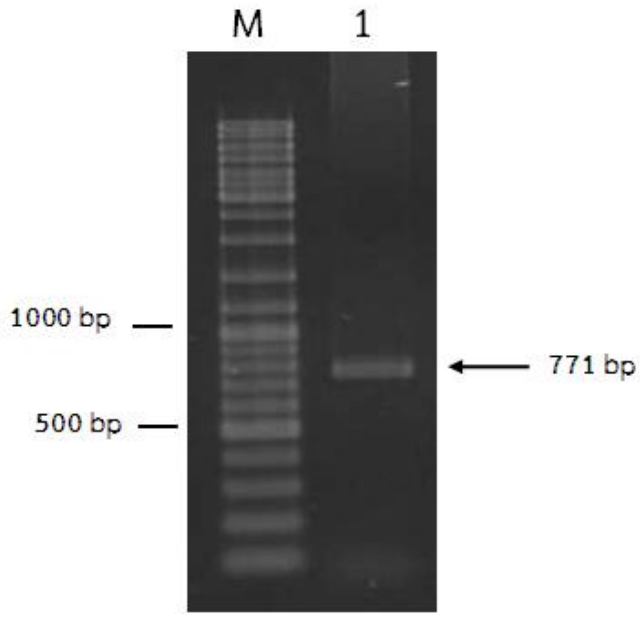
4. การผลิตแอนติซีรัมในสัตว์ทดลอง

ดำเนินการฉีดกระต่าย จำนวน 5-6 ครั้ง และเจาะเลือดครั้งละประมาณ 30-40 มิลลิลิตร เพื่อนำไปปั่น และเก็บน้ำใส ได้แอนติบอดีครั้งละ 10-15 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -80 °ซ ผลการตรวจสอบคุณภาพของแอนติซีรัมที่ได้จากการเจาะเลือด จำนวน 7 ครั้ง โดยวิธี indirect ELISA โดยทำการเจือจางแอนติซีรัมจาก 1:10 ถึง 1:1,000,000 พบว่า แอนติซีรัมจากการเจาะเลือดครั้งที่ 5-7 มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยทำปฏิกิริยาได้จนถึง 1:10,000 (ตารางที่ 1) ฉะนั้นเมื่อนำไปใช้ในการตรวจสอบ ต้องทำให้เจือจาง 1: 500 และ 1: 1,000

5. การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตได้

จากการทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมกับตัวอย่างสับปะรดที่แสดงอาการเหี่ยว โดยเปรียบเทียบชนิดของ plate พบว่า Polysorp ของ Nunc ให้ปฏิกิริยาดีกว่า ELI/RIA Plate ของ Costar ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นสีเหลืองทุกหลุม ทำให้ไม่สามารถอ่านผลความแตกต่างระหว่างสับปะรดเป็นโรคและสับปะรดปกติได้ จากการตรวจสอบประสิทธิภาพในการตรวจสอบโรคเหี่ยวของสับปะรด

พบว่า เกิดปฏิกิริยาเกิดค่อนข้างต่ำ ทำให้อ่านค่า absorbance ของต้นเป็นโรคได้ต่ำใกล้เคียงกับค่าที่อ่านได้จากต้บปกติ แต่สามารถนำแอนติซีรัมที่ผลิตได้ไปใช้ตรวจหาอนุภาคไวรัส โดยวิธี Immunosorbent electron microscopy (IEM) โดยนำแอนติซีรัมมาทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นพืชเป็นโรคบนกริด แล้วนำไปตรวจหาอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope



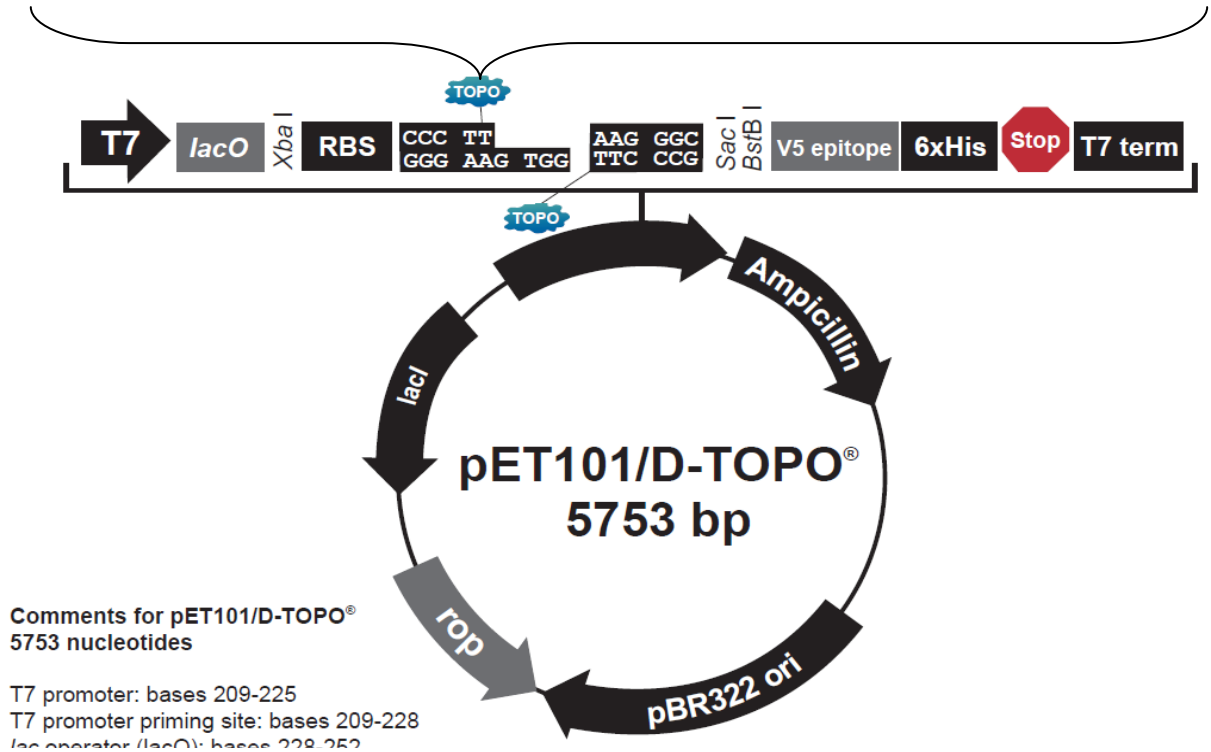
รูปที่ 1. การเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส โดยใช้ไพรเมอร์ pet101_PMWaV1 และ pet101_PMWaV1R วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis

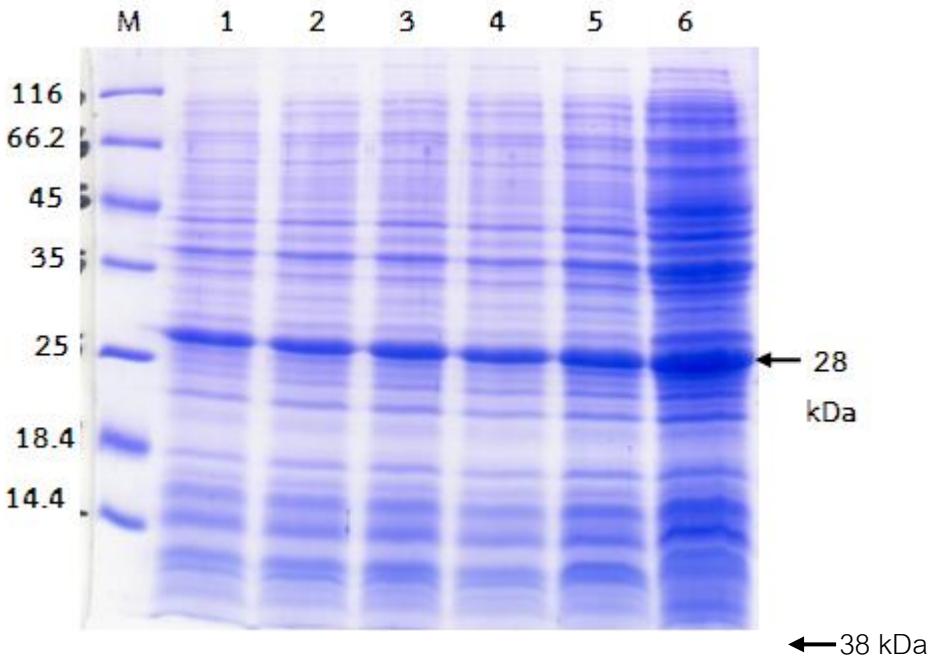
M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb Ladder, Fermentas)

1 = ดีเอ็นเอของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส จากสับปะรดที่เป็นโรคเหี่ยว

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

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



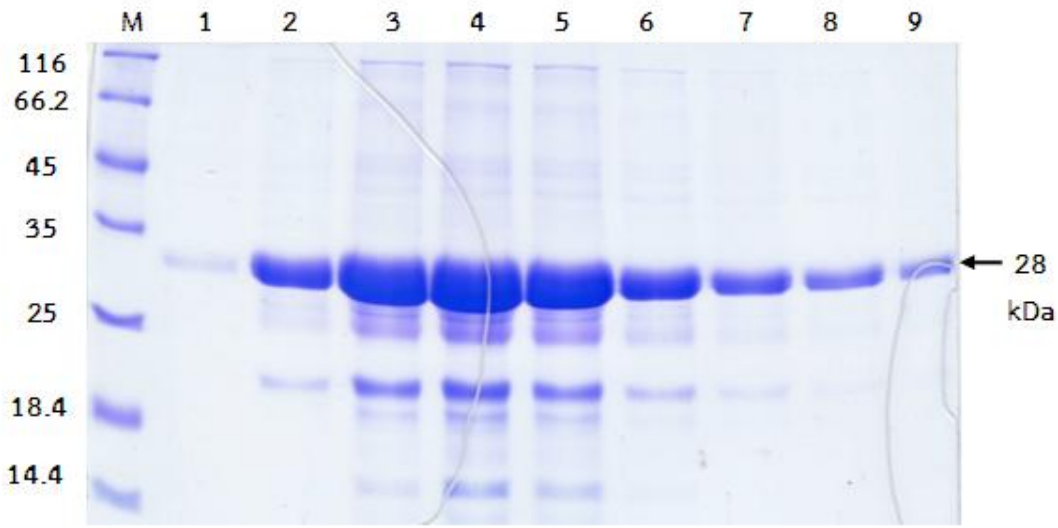


รูปที่ 3. ผลการชักนำให้สร้างโปรตีนในพลาสมิดสายผสม pET160/GW/D-TOPO®-*cp* ด้วยสาร IPTG ที่ระยะเวลาต่างๆกัน ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

M : โปรตีนมาตรฐาน (Fermentas)

1 : โปรตีนที่แยกได้ก่อนการชักนำด้วย IPTG

2-6 : โปรตีนที่แยกได้หลังการชักนำ 2 4 6 8 และ 24 ชั่วโมง



รูปที่ 4. ปริมาณโปรตีนที่สังเคราะห์ได้หลังจากผ่าน Ni-NTA column ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

M : โปรตีนมาตรฐาน (Fermentas)

1-9 : โปรตีนที่แยกได้ในแต่ละ fraction ตั้งแต่ 1-9 หลังการใช้ eluting buffer

ตารางที่ 1. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตได้ จากการเจาะเลือด 7 ครั้ง

ความเข้มข้น / จำนวนครั้งการเจาะเลือด	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
NS	0.315	0.149	0.094	0.091	0.087	0.088
AS1	1.131	0.682	0.317	0.159	0.117	0.090
AS2	1.225	1.053	0.525	0.264	0.147	0.104
AS3	1.194	0.932	0.471	0.198	0.115	0.103
AS4	1.368	1.167	0.741	0.352	0.148	0.109
AS5	1.443	1.286	1.013	0.461	0.199	0.116
AS6	1.309	1.243	0.863	0.408	0.171	0.113
AS7	1.411	1.062	0.987	0.569	0.250	0.136

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 จากนั้นดำเนินการคัดเลือกโคลนที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ในเซลล์ของ *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 28 กิโลดาลตัน จากการตรวจปริมาณโปรตีนทีหลังการแยกให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ปรากฏว่า เริ่มพบ band ขนาด 28 กิโลดาลตันทุก fraction (fraction 2-9) แล้วนำโปรตีน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไปฉีดเข้าใต้ผิวหนัง บริเวณคอของกระต่าย โดยผสมกับ Freund's adjuvant ทุก 2 สัปดาห์ รวม 5-6 ครั้ง และเจาะเลือดเพื่อแยกแอนติบอดีออกมาจากเม็ดเลือดแดง ทดสอบไตเตอร์ของแอนติบอดีจากการเจาะเลือดแต่ละครั้ง พบว่า แอนติซีรัมที่เจาะครั้งที่ 5-7 มีไตเตอร์สูงสุด สามารถทำปฏิกิริยากับ recombinant protein (10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) ที่ใช้ฉีดสัตว์ทดลองได้จนถึง 1:10,000 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมกับตัวอย่างใบสับปะรดโรคเหี่ยว พบว่า เกิดปฏิกิริยาเกิดค่อนข้างต่ำ ทำให้อ่านค่า absorbance ของต้นเป็นโรคได้ต่ำใกล้เคียงกับค่าที่อ่านได้จากต้บปกติ แต่สามารถนำแอนติซีรัมที่ผลิตได้ไปใช้ตรวจหาอนุภาคไวรัส โดยวิธี Immunosorbent electron microscopy (IEM) โดยนำแอนติซีรัมมาทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นพืชเป็นโรคบนกริด แล้วนำไปตรวจหาอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope)

เอกสารอ้างอิง

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

ลำพึง เรียงวงษ์ สุภาภรณ์ เอี่ยมเข่ง และ อรวรรณ ชัชวาลการพาณิชย์. 2547. การสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสเส้นใบเหลืองกระเจี๊ยบเขียวในระบบเซลล์แบคทีเรีย. รายงานการ

ประชุมทางวิชาการ 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.