การผลิตโพลีโคลนอลแอนติซีรัมจำเพาะต่อโปรตีนห่อหุ้มของไวรัสก่อโรคใบด่างเหลืองของมะเขือเปราะ

Production of polyclonal antiserum specic to coat protein gene of *Eggplant yellow mosaic virus* (EYMV)

สิทธิศักดิ์ แสไพศาล [1/ 2/] ศรีเมฆ ชาวโพงพาง [1/]

Sitthisak Saepaisal [1/ 2/] Srimek Chowpongpang [1/]

ABSTRACT

Polyclonal antiserum of *eggplant yellow mosaic virus* (EYMV) was produced. The recombinant protein synthesized from clone EYMV coat protein obtained from the plasmid DNA extraction of diseased eggplant. The DNA was amplified using the primers EYMV-CPF and EYMV-CPR which designed from the coat protein of EYMV. The obtained 777 bp DNA fragment was cloned into pUC57 plasmid DNA vector. The plasmids were extracted and ligated with the expression vector pET200/D-TOPO (Invitrogen). The recombinant plasmid was cloned into *E. coli* competent cell (Top10). The positive clone was selected and transformed into *E. coli* BL21 (DES 3). The bacteria were cultivated in 2xYT medium supplemented with 50 mg/l kanamycin, then protein synthesis was induced with IPTG. The highest protein production was obtained at 24 hours. The obtained 28 kDa protein was purified in Ni-NTA column for the antibody production in rabbit. The antiserum could be used for the detection of the recombinant protein for Indirect ELISA and Nitrocellulose membrane-Enzyme-linked immuno sorbent assay (NCM-ELISA) and conferred specificity. The IgG of EYMV-CP was used for the detection of the diseased plant with 1:10-1:80 concentrations.

Key words: eggplant, Yellow mosaic virus, antiserum , EYMV

[1/] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bang kean Campus, Bangkok 10900, THAILAND

[1/] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร วิทยาเขตบางเขน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ 10900

[2/] Plant Pathology Research Group, Plant Protection Research and Development Ofce, Department of Agriculture

[2/] กลุ่มวิจัยโรคพืช สานักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

การผลิตโพลีโคลนอลแอนติซีรัมของไวรัสสาเหตุโรคใบด่างของมะเขือเปราะโดยใช้ recombinant protein ที่สังเคราะห์จากโคลนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ *Eggplant yellow mosaic virus* (EYMV) ที่ได้มาจากการแยกสกัดดีเอ็นเอแบบพลาสมิดจากใบมะเขือเปราะที่เป็นโรคใบด่างของมะเขือเปราะ นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์คู่ที่ออกแบบจากส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของ EYMV คือ EYMV-CPF และ EYMV-CPR สังเคราะห์ได้ชิ้นของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 777 bp นำไปโคลนเข้าสู่เวคเตอร์ pUC57 plasmid DNA และคัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปในพาหะ ทำการสกัดพลาสมิดนำมาต่อเชื่อม (ligation) เข้ากับพลาสมิดพาหะ (expression vector) pET200/D-TOPO (Invitrogen) และส่งถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้า *E. coli* competent cell (Top10) คัดเลือกโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกอยู่ transformation เข้า *E. coli* BL21 (DES 3) เลี้ยงในอาหารเหลว 2XYT ที่มี kanamycin 50 มล./ล. ชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนด้วย IPTG พบว่าระยะเวลาที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้สูงสุด คือ 24 ชม. ให้โปรตีนที่มีขนาดประมาณ 28 กิโลดาลตัน แยกโปรตีนของเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column และนำไปผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีในกระต่าย ได้แอนติซีรัมที่สามารถใช้ตรวจสอบ recombinant protein ที่ใช้เป็นแอนติเจนด้วยวิธี Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) พบว่า แอนติซีรัมจากการฉีดกระตุ้นครั้งที่ 5 ให้ค่าไตเตอร์สูงสุดที่ 1:204,800 เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมกับตัวอย่างใบมะเขือเปราะที่แสดงอาการด่างและใบมะเขือเปราะปกติด้วยวิธี Indirect ELISA และ Nitrocellulose membrane-ELISA (NCM-ELISA) พบว่ามีความจำเพาะและให้ปฏิกิริยาเป็นบวก และสามารถใช้ IgG ของ EYMV-CP ตรวจตัวอย่างมะเขือเปราะที่เป็นโรคได้ตั้งแต่ความเข้มข้น 1:10-1:80

คำหลัก : มะเขือเปราะ, โรคใบด่างเหลือง, แอนติซีรัม, EYMV

คำนำ

มะเขือเปราะ (Thai eggplant) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Solanum melongena* L. จัดอยู่ในวงศ์ *Solanaceae* กลุ่ม พืชใบเลี้ยงคู่ สกุลเดียวกับมะเขือเทศ พริก มันฝรั่ง (กิตติ, 2555) พืชตระกูลมะเขือทำรายได้ให้กับประเทศไทยในด้านการส่งออกทั้งผลสด และการผลิตเมล็ดพันธุ์ ซึ่งแนวโน้มของการส่งออกเพิ่มขึ้นทุกปี แต่พืชตระกูลมะเขือมีศัตรูพืชรบกวนหลายชนิด มีทั้งแมลง เชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย และเชื้อไวรัส ซึ่งเชื้อไวรัสที่สำคัญที่ทำความเสียหายทั้งปริมาณและคุณภาพของผลผลิตของมะเขือ คือ *Eggplant yellow mosaic virus* (EYMV) เชื้อไวรัสนี้จะทำให้ต้นมะเขือมีอาการใบด่างเหลือง จึงเรียกโรคนี้ว่า โรคใบด่างเหลืองของมะเขือ (*Eggplant*

yellow mosaic disease, EYMD) มีอาการเริ่มแรกคือเส้นใบใส (vein clearing) ต่อมาเป็นจุดสีเหลือง และขยายใหญ่เป็นอาการใบด่างเหลือง (yellow mosaic) ผลมีลักษณะอาการด่างเขียวเข้มสลับเหลืองหรือด่างเป็นแถบขาว ผลมีขนาดเล็กกว่าปกติ ต้นแคระแกร็น

เชื้อ EYMV เป็นเชื้อไวรัสที่มีอนุภาคทรงกลม หลายเหลี่ยมที่ไม่สมบูรณ์ (Incomplete icosahedra) อยู่เป็นคู่ (geminate) มีขนาดอนุภาคกว้าง 18x20 นาโนเมตร ยาวประมาณ 30 นาโนเมตร (Rybicki *et al*., 2000) อยู่ในสกุล Begomovirus กลุ่ม Geminivirus มี nucleotide เป็น ssDNA โดยมีแมลงหวี่ขาว หรือ whitefly (*Bemisia tabaci*) เป็นพาหะ แมลงหวี่ขาวเป็นแมลงปากดูดในวงศ์ Aleuroidae อันดับ Homoptera ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยดูดกินน้ำเลี้ยงจากส่วนใต้ใบพืช เป็นแมลงที่มีพืชอาศัยกว้าง การถ่ายทอดเชื้อ EYMV ของแมลงหวี่ขาวเป็นแบบ persistent อนุภาคของไวรัสจะเข้าไปวนอยู่ในตัวแมลงโดยไม่มีการเพิ่มปริมาณ สุดท้ายจะพักตัวอยู่ในต่อมน้ำลายของตัวแมลง เป็นเวลาทั้งหมดประมาณ 20-24 ชม. (incubation period) แล้วใช้เวลาอีกประมาณ 15 นาที (transmission period) ในการดูดกินพืชต้นใหม่ทำให้เป็นโรคได้ แม้เชื้อไม่สามารถถ่ายทอดผ่านทางไข่แต่สามารถอาศัยอยู่ในตัวแมลงได้ตลอดช่วงชีวิต (Morin *et al*.,1999; Mansour and Al-Musa, 1992; ศุภลักษณ์, 2536) EYMV มีพืชอาศัยค่อนข้างจำกัดอยู่ในวงศ์ Solanaceae ได้แก่ พริกขี้หนู ลำโพง มะเขือเทศ ยาสูบ (*Nicotiana tabacum, N. glutinosa, N. clevelandii*) มะเขือม่วง และมะเขือเปราะ นอกจากนี้แล้วเชื้อ EYMV ยังสามารถถ่ายทอดได้โดยการทาบกิ่ง แต่เชื้อไวรัสในกลุ่มนี้ไม่สามารถถ่ายทอดด้วยวิธีกล (Mechanical transmision) หรือผ่านไปกับเมล็ดได้ (Seed-borne transmision)

วิธีการจำแนกเชื้อ EYMV ที่มีประสิทธิภาพและให้ผลแม่นยำสูงที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันมี 2 วิธี ได้แก่ วิธี Reverse transcription - Polymerase chain reaction (RT-PCR) และวิธีทางอิมมูโนวิทยา (Immunology) วิธี RT-PCR ใช้คู่ไพรเมอร์ (primers) ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อ EYMV แต่วิธีนี้จะค่าใช้จ่ายสูง และใช้เวลานาน รวมทั้งนักวิจัยต้องมีทักษะในด้านนี้ และต้องมีห้องปฏิบัติการด้าน Molecular biology ส่วนวิธีอิมมูโนวิทยา แบบ Enzyme link-immuno sorbent assay (ELISA) เป็นอีกวิธีที่มีประสิทธิภาพ และมีความเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อ EYMV เช่นกัน ให้ผลการตรวจที่รวดเร็ว และค่าใช้จ่ายถูกกว่าวิธี RT-PCR ดังนั้น วิธี ELISA จึงเป็นวิธีที่มีความเหมาะสมและมีประสิทธิภาพ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการสามารถตรวจได้เอง แต่การตรวจโดยวิธีนี้ต้องใช้แอนติซีรัมต่อเชื้อไวรัส EYMV ที่มีคุณภาพในการตรวจสอบ การผลิตแอนติซีรัมที่มีคุณภาพและมีความเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อด้วยการแยกเชื้อไวรัสบริสุทธิ์แล้วนำไปฉีดเข้าสัตว์ทดลอง ในแต่ละครั้งไม่สามารถควบคุมความเข้มข้นแอนติซีรัม และคุณภาพของ immunity ต่อเชื้อไวรัสได้ เพราะมีปัจจัยหลาย

อย่างที่ควบคุมได้ยาก เช่น ความบริสุทธิ์ของไวรัสจากใบพืช ปริมาณความเข้มข้นของเชื้อไวรัสบริสุทธิ์ไม่เพียงพอ อนุภาคของไวรัสอาจสลายตัวง่าย ทำให้คุณภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตได้ในแต่ละครั้งไม่เป็นมาตรฐานเดียวกัน และไม่สามารถผลิตในปริมาณมาก ๆ จึงยากต่อการผลิตให้เพียงพอในเชิงการค้า

เนื่องจากปัญหาดังกล่าวข้างต้น จึงมีการนำเทคโนโลยีการผลิตโปรตีนในระบบเซลล์แบคทีเรีย มาพัฒนาช่วยในการผลิตโพลีคลอนอลแอนติบอดีสำหรับไวรัสหลายชนิดและได้ผลดี Cerovska *et al.,* (2003) ได้ผลิตโพลีคลอนอลแอนติบอดีจากยีนโปรตีนห่อหุ้มไวรัส (CP gene) ของเชื้อ *Potato mop-top virus* (PMTV) โดยการโคลนชิ้นของยีน CP เข้าสู่ expression vector แล้วนำไปเพิ่มปริมาณโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* จากนั้นนำมาแยกให้บริสุทธิ์ จึงนำโปรตีนที่ได้ไปฉีดเข้าสัตว์ทดลองเพื่อผลิตแอนติซีรัม แอนติซีรัมที่ได้สามารถใช้ตรวจหาไวรัส PMTV ด้วยเทคนิค ELISA ขณะที่ Osmar *et al.*, (2004) ได้นำยีน CP ของเชื้อ Apple stem grooving virus (ASGV) มาเพิ่มปริมาณโดย เทคนิค RT-PCR เพื่อผลิตแอนติซีรัมเช่นเดียวกัน พบว่าแอนติซีรัมที่ได้สามารถใช้ตรวจหาไวรัส ASGV โดยใช้เทคนิค ELISA ได้ผลดีเช่นเดียวกัน สำหรับการวิจัยในประเทศ ลำพึงและคณะ (2547) ได้สังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสเส้นใบเหลืองกระเจี๊ยบเขียวในระบบเซลล์แบคทีเรีย แยกโปรตีนออกจากเซลล์แบคทีเรีย และนำไปฉีดกระตุ้นกระต่ายทดลองสามารถผลิตแอนติซีรัมที่มีประสิทธิภาพสูงและนำไปรตรวจเชื้อไวรัสสาเหตุโรคได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตแอนติซีรัมของเชื้อ EYMV โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ในการโคลน CP ยีน ของเชื้อ EYMV เพื่อนำไปเพิ่มปริมาณโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย เป็นแอนตีเจนสำหรับไปฉีดกระต่ายเพื่อให้สร้างแอนติซีรัมของเชื้อ EYMV ที่มีคุณภาพใช้ในการตรวจสอบจำแนกเชื้อ EYMV

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (coat protein gene, CP gene)

1.1 การเตรียมตัวอย่างพืชเป็นโรค

เก็บตัวอย่างต้นมะเขือเปราะที่มีอาการใบด่างเหลืองจากแปลงปลูกมาตรวจสอบจำแนกด้วยวิธี PCR โดยใช้ Universal primer (primer: GEM U-CP1 และ GEM U-CP2) ของกลุ่ม Geminivirus เลือกต้นที่ตรวจพบ DNA ใน genome ของไวรัส มาเป็นตัวอย่างในการถ่ายทอดเชื้อสำหรับการทดลองต่อไป

1.2 การเตรียมไพรเมอร์ (primer)

ออกแบบไพรเมอร์ ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนใน genome ของไวรัส ตรงยีนในส่วนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (coat protein gene, AV1) สาเหตุของโรคใบด่างเหลือง (EYMV-CP) ด้วยการสืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และใช้โปรแกรม Oligonucleotide Properties เพื่อออกแบบและวิเคราะห์ไพรเมอร์ ๆ คู่ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนใน ribosome ของ

ไวรัส สาเหตุของโรคใบด่าง (EYMV-CP) ที่นำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอ ใน กระบวนการ cloning เข้าสู่ vector ได้แก่

EYMV-CPF 5'ATGGCTGATTCGAGCAAACAAAAACAAC 3'

EYMV-CPR 5'TTTGCGTCCACCCATAAAGATGTGCG 3'

1.3 การสกัดดีเอ็นเอของโรคใบด่างจากใบมะเขือเปราะ แบบพลาสมิด

บดใบพืชเป็นโรคในโกร่ง โดยเติม TE buffer (10 mM Tris-HCl; (pH 8.0), 1 mM EDTA+β mercapto 1%) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทำ vortex ประมาณ 30 วินาที จากนั้นเติม lysis buffer (0.2 mM NaOH, 1% SDS) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติม precipitation buffer (5 M potassium acetate, 96% acetic acid) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และคลอโรฟอร์ม 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วแช่ลงในน้ำแข็ง 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 37 °ซ ดูดส่วนน้ำใสใส่หลอดใหม่ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติม isopropanol ปริมาตรเท่ากับส่วนน้ำใส ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปตกตะกอนด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนด้วย 70% เอทานอล ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ แล้วปั่นเหวี่ยงตกตะกอนอีกครั้ง ที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เทเอทานอลทิ้ง ผึ่งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง แล้วจึงเติม dH_2O ที่มี RNase A (ความเข้มข้น 1 มก./มล.) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ -20 °ซ เพื่อการทดลองต่อไป

1.4 การเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วนของ CP gene ด้วยเทคนิค PCR

นำดีเอ็นเอของเชื้อที่ได้ในข้อ 1.3 มาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ที่มีความจำเพาะกับส่วนของ CP gene ของไวรัสจากข้อ 1.2 จัด PCR Profile 25 l /Reaction ดังนี้

5x Phusion® HF buffer	2.5	ไมโครลิตร
10 μM dNTPs	1.0	ไมโครลิตร
Primer EYMV-CPF (10 μM)	0.5	ไมโครลิตร
Primer EYMV-CPF (10 μM)	0.5	ไมโครลิตร
dH_2O	18.5	ไมโครลิตร
Template (ดีเอนเอจากข้อ 1.3)	1.0	ไมโครลิตร
Phusion® Hot Start II DNA Polymerase (2 Unit/μl)	1.0	ไมโครลิตร

1.7 การโคลนยีน CP-EYMV เข้าสู่ expression vector

นำยีนสังเคราะห์ที่ได้จากข้อ 1.6 มาเชื่อมต่อ (ligation) เข้ากับพลาสมิดพาหะ expression vector pET200/D-TOPO (Invitrogen) จากนั้นทำการส่งถ่ายพลาสมิดสายผสม (transformation) เข้าสู่ *E. coli* completent cell (Top10) โดยวิธี Heat-shock ที่ 42 °ซ นาน 90 นาที และแช่บนน้ำแข็งทันที นาน 3 นาที หลังจากนั้นนำมาเกลี่ยบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ 2XYT ที่มีสารปฏิชีวนะ kanamycin 50 มก./ล. ผสมอยู่ในอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 24 ชม. คัดเลือกโคโลนีสีขาวของแบคทีเรีย *E. coli* BL21 บนอาหาร 2XYT ที่ได้รับการถ่ายทอดพลาสมิด pET200/D-TOPO สายผสมที่มียีน CP-EYMV สอดแทรกอยู่ โดยสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis (Brinboim and Doly, 1979) และตรวจสอบชิ้นยีน CP-EYMV โดยใช้ไพรเมอร์ EYMV-CPF และ EYMV-CPR จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนของชิ้นดีเอ็นเอ CP-EYMV ด้วยโปรแกรม Blast และนำมาเปรียบเทียบเพื่อหาความเหมือนหรือคล้ายกัน

2. ระยะเวลาที่เหมาะสมในการชักนำการสังเคราะห์ recombinant protein CP-EYMV ในเซลล์แบคทีเรีย

นำแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DES 3) ที่มีพลาสมิดสายผสมยีน CP-EYMV สอดแทรกอยู่ภายในเซลล์ มาเลี้ยงในอาหารเหลว 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin 50 มก./ล. ในเครื่องบ่มแบบเขย่า ที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 12-16 ชม. เพื่อใช้เป็น starter จากนั้นแบ่งใส่ในอาหารเหลว 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin 50 มก./ล. ในอัตราส่วนของเชื้อ 10% ของอาหาร เขย่าต่ออีก 4 ชม. และเติม IPTG (Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyra noside) ในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงเชื้อต่อโดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ ในเครื่องบ่มแบบเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที เริ่มต้นเก็บอาหารเหลวเลี้ยงเซลล์ที่เวลา 0, 2, 4, 6 และ 24 ชม. ตามลำดับ ครั้งละ 1 มล. เพื่อนำมาวิเคราะห์หาขนาดและปริมาณโปรตีน CP-EYMV ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยนำเซลล์ที่เก็บมาปั่นตกตะกอน ที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 50 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ -20 °ซ แล้วเติม 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 pET200/EYMV-CP หลังจากเลี้ยงในอาหารเหลว 2XYT ที่เวลาอันเหมาะ

4.2 การย้อมแถบโปรตีนใน SDS-PAGE ด้วย Coomassie brilliant blue R250

ย้อมเจลที่ได้ใน staining solution (0.25% (w/v) Coomassie brilliant blue R-250) ในfixing solution (40% (v/v) methanol, 7% (v/v) acetic acid) เป็นเวลา 1 ชม. และล้างสีพื้นด้วยสารละลาย destaining solution I (40% (v/v) methanol, 7% (v/v) acetic acid in distilled water) นาน 1 ชม. และตามด้วย destaining solution II (5% (v/v) methanol and 7% (v/v) acetic acid in distilled water) นาน 30 นาที เขย่าบน shaker จนกระทั่งพื้นเจลใสเห็นแถบโปรตีนติดสีน้ำเงินเด่นชัดขึ้น

5. การผลิตแอนติซีรัมในสัตว์ทดลองและทดสอบคุณภาพ

ใช้กระต่ายพันธุ์ New Zealand White เพศเมีย อายุประมาณ 5 เดือน ก่อนฉีดกระต่ายด้วย recombinant protein เจาะ normal serum ไว้ใช้ในปฏิกิริยาควบคุม ผสมแอนติเจน recombinant protein (CP- EYMV) ของเชื้อที่บริสุทธิ์จากข้อ 4 จำนวน 2 มก./มล. กับ complete Freund's adjuvant ในอัตรา 1:1 ให้เข้ากันเป็น emulsion ในการฉีดกระต่ายครั้งแรก และใช้ incomplete Freund's adjuvant ในอัตรา 1:1 สำหรับการฉีดครั้งต่อๆ ไปอีก 4 ครั้ง ทุกครั้งฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) บริเวณคอ ประมาณ 4-5 จุด ฉีดทุก 2 สัปดาห์ เริ่มเจาะเลือดที่เส้นเลือดบริเวณใบหู หลังจากฉีดครั้งที่ 2 และเจาะเลือดทุก ๆ 1 สัปดาห์ อีก 5 ครั้ง วางเลือดที่เจาะได้ไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชม. ก่อนนำไปเก็บที่ 4 °ซ นาน 24 ชม นำซีรัมส่วนใสมาหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเม็ดเลือดแดงที่ความเร็ว 8,000 g นาน 10 นาที แบ่งเก็บแอนติบอดีส่วนที่ใสใส่หลอด 1-1.5 มล. ไว้ที่ -80 °ซ ทดสอบหาค่าไทเทอร์ (titer) ของแอนติซีรัมโดยวิธี Indirect ELISA ใช้ recombinant protein 10 นาโนกรัม/หลุม เป็นแอนติเจน ใช้แอนติบอดีที่ได้จากการเจาะเลือดกระต่าย 6 ครั้ง เจือจางแอนติซีรัมแบบ 2-fold dilution โดยใช้ blocking buffer เจือจางให้มีความเข้มข้นเป็น 1:100 1:200 1:400 1:800 1:1,600 1:3,200 1:6,400 1:12,800 1:25,600 1:51,200 1:102,400 และ 1:204,800 ใช้ Goat anti-rabbit IgG ที่ติดฉลากด้วย alkaline phosphatase เจือจาง 1:10,000 เป็นแอนติซีรัมตัวตรวจสอบ และตรวจสอบปฏิกิริยาโดยใช้ซับสเตรท p-nitrophenyl phosphstase อ่านผลด้วยเครื่อง Micro ELISA Reader ที่ค่าความดูดกลืนแสง 405 นาโนเมตร

6. การทดสอบประสิทธิภาพความจำเพาะของแอนติซีรัมต่อ CP-EYMV

ทดสอบประสิทธิภาพ และความจำเพาะของแอนติซีรัมในการทำปฏิกิริยากับโปรตีน CP-EYMV ในน้ำคั้นพืชเป็นโรค กับพืชปกติ ด้วยเทคนิค Indirect-ELISA พืชเป็นโรคที่ใช้ทดสอบได้แก่ ใบมะเขือเปราะ (พันธุ์เจ้าพระยา), ใบพริก

(พันธุ์ห้วยสีทน), ใบมะเขือเทศ (พันธุ์สีดา) โดยพืชที่นำมาใช้ได้ตรวจเช็คด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer GEM U-CP1 และ GEM U-CP2 ว่าทุกชนิดติดเชื้อ Geminivirus นำใบพืชมาบดใน coating buffer ในอัตรา 1 ก. : 10 มล. (ใบพืช: buffer) หยดน้ำคั้นพืชลงในหลุมทดสอบไมโครเพลท (ชนิด Polystyrene Non-Sterile ของ COSTAR) 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 °ซ นาน 1-2 ชม. แล้วนำไมโครเพลทมาล้างด้วย phosphate buffer saline ที่มี tween-20 ผสมอยู่ (PBS) 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที Blocking ด้วย 5% BSA ใน PBS-T หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 °ซ นาน 1 ชม. ล้างไมโครเพลทด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง หยอดแอนติซีรัมจากการเจาะเลือดครั้งที่ 5 ที่เจือจางใน PBS-T buffer 1:100-1:204,800 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 °ซ นาน 1 ชม. ล้างไมโครเพลทด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง แล้วหยอด Goat-Anti Rabbit อัตรา 1:10,000 ใน PBS-T buffer 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 °ซ นาน 1 ชม. นำเพลทมาล้างอีก 3 ครั้งใน PBS แล้วหยอด p-nitrophenyl phosphatase substrate (5 มก./ substrate buffer 10 มล.) หลุมละ 100 ไมโครลิตร และอ่านผลด้วยเครื่องอ่าน ELISA Reader

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (coat protein gene, CP gene)

การใช้คู่ไพรเมอร์ Forward-CPF และ Reverse-CPR ที่ออกแบบมาเพื่อโคลนชิ้นดีเอ็นเอเฉพาะส่วนของยีน CP-EYMV โดยใช้ดีเอ็นเอจากยีนสังเคราะห์เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ต้นแบบ พบว่าสามารถเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอขนาด 777 bp ได้ (Figure 1) นำยีนสังเคราะห์ที่ได้ไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pET200/D-TOPO (Invitrogen) expression vector และถ่ายฝากเข้าไปในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21 บนอาหาร 2XYT ได้โคโลนีที่มีชิ้นยีน CP-EYMV เชื่อมต่ออยู่กับพลาสมิด pET200/D-TOPO เป็นพลาสมิดสายผสม และโคลนที่ได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP-EYMV มีขนาดประมาณ 777 คู่เบส สามารถแปลรหัสโปรตีน CP-EYMV ได้กรดอะมิโนมีความยาวเท่ากับ 258 กรดอะมิโน (Figure 2) แต่ไม่พบ stop codon (TAA, TAG, TGA) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP-EYMV ของเชื้อสาเหตุโรคใบด่างเหลืองมะเขือเปราะ เปรียบเทียบกับยีน CP ของเชื้อสาเหตุ

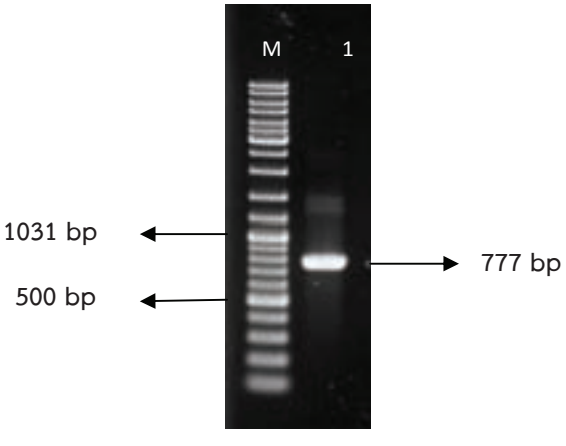

Figure 1 The amplicon of viral code protein gene using primer EYMV-CPF and EYMV-CPR on agarose gel electrophoresis. M = DNA standard 1 = DNA of viral code protein from infected leave (EYMV)

1 MPKRSIDTVT SLPMSITRRR LNFGSQYSLP ASAPTAPGMS YKRRAWKNRP

51 MYTKPRFYRW RRSSDVPRGC EGPCKVQSFE QRHDITHTGK VLCVSDVTRG

101 NGITHRIGKR FCVKSVYVMG KIWMDENIKL KNHTNTVMFW LVRDRRPVTT

151 PYGFGELFNM YDNEPSTATI KNDLRDRVQV LHRFSASLTG GQYASKEQAV

201 IKKFFRVNNY VVYNHQEAAK YENHTENALL LYMACTHASN PVYATLKIRI

251 YFYDNVTN*

Figure 2 The amino acid sequence of EYMV-CP-Thai General Description

โรคใบหงิกเหลืองของมะเขือเทศ (TYLCV) ที่มีรายงานไว้แล้วใน GenBank ที่ใช้สำหรับเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในเว็บไซด์ ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html) พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP-EYMV มีความเหมือนกัน 73.4 %

2. ระยะเวลาที่เหมาะสมในการชักนำการสังเคราะห์ recombinant protein CP-EYMV ในเซลล์แบคทีเรีย

จากการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DES 3) ที่มีพลาสมิดสายผสมในอาหารเหลว 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin เป็นเวลา 12-16 ชม. เพื่อใช้เป็น starter ทำการชักนำให้มีการสังเคราะห์ recombinant protein CP-EYMV ด้วย IPTG (Isopropyl--D-thiogalactopyranoside) เป็นเวลา 2, 4, 6 และ 24 ชม. พบว่า ของการชักนำให้เซลล์แบคทีเรียเริ่มผลิตโปรตีนด้วย IPTG ที่ 2 ชม. และหลังจากการเติม IPTG ที่ 24 ชม. เซลล์แบคทีเรียสามารถสร้าง recombinant protein CP-EYMV ได้ในปริมาณมาก เมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE พบว่าเกิดแถบโปรตีน CP-EYMV ที่ขนาด 28 กิโลดาลตัน แต่ไม่พบแถบโปรตีน ดังกล่าวเมื่อเซลล์แบคทีเรียไม่ถูกชักนำ (Figure 3) ขณะที่ส่วนใสและตะกอนที่ได้จากการทำให้เซลล์แตกของ recombinant protein CP-EYMV ที่ได้พบว่าอยู่ในส่วนสารละลายใสมากกว่าอยู่ใน

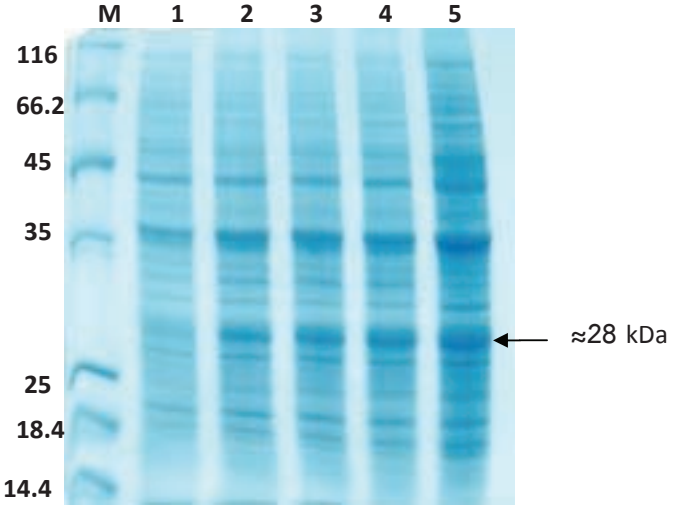

Figure 3 The result of protein produced in plasmid pET200/D-TOPO® within IPTG at deferent timing by using SDS-PAGE

M = Protein standard (Fermentas®)

1 = the isolated protein before induced with IPTG

2-6 = the isolated protein after induced 2 4 6 a nd 24 h

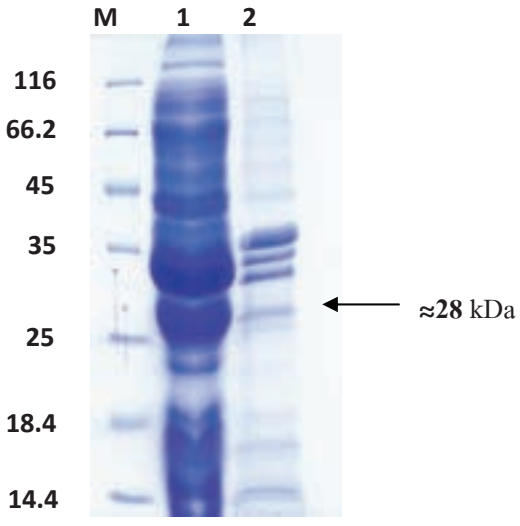

Figure 4 15% SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of purified CP-EYMV by using Ni-NTA column

M : Protein standards (Fermentas®)

1 : Supernatant 2 : Pellet

กากตะกอนเซลล์ (Figure 4) จากขนาดของโปรตีนที่ได้แสดงให้เห็นว่าการสังเคราะห์ยีนในปฏิกิริยาลูกโซ่มีความถูกต้อง ดังนั้นระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการชักนำการสร้าง recombinant protein CP-EYMV คือ 24 ชม.

3. การแยกสกัดโปรตีน CP-EYMV จากเซลล์แบคทีเรียให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Ni-NTA column

การแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA Superflow (QIAGEN) และทำ Elution buffer fraction แล้วนำแต่ละ fractions ที่ผ่านคอลั่มน์ไปตรวจสอบแถบโปรตีนด้วย วิธี 15% SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) พบว่าในแต่ละ fraction ที่ทำการเก็บทั้งหมด 9

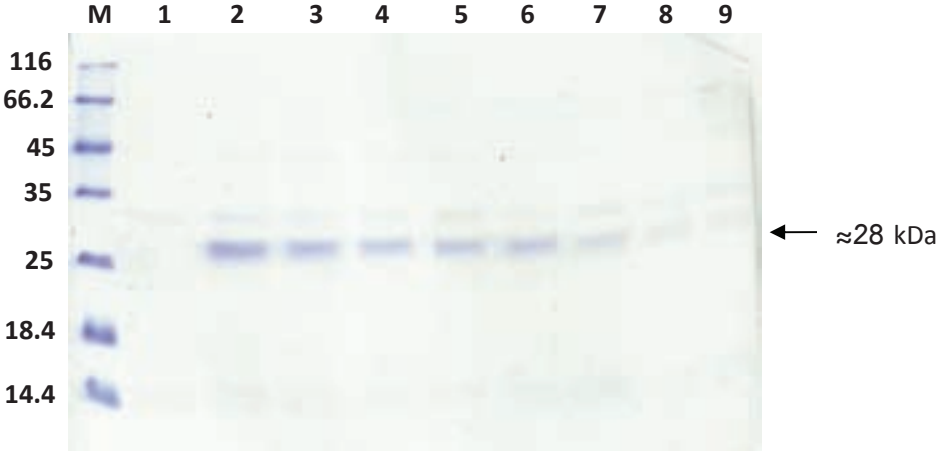

Figure 5 The number of synthesized protein after fitted Ni-NTA column using SDS-PAGE

M = protein standard

1-9 = the isolated protein of deferent fraction form 1-7 after eluting buffer

fractions (F1-F9) มีปริมาณโปรตีนใน fraction ที่ F2-F9 สามารถตรวจพบแถบของ recombinant protein CP-EYMV ที่มีขนาดประมาณ 28 กิโลดาลตัน มีความบริสุทธิ์และได้ปริมาณโปรตีนที่เพียงพอ (Figure 5) สำหรับการนำไปใช้เป็นแอนติเจนในการฉีดเข้าสัตว์ทดลอง โปรตีน CP-EYMV เป็นโปรตีนที่กระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันต่ำและเมื่อนำ โปรตีน CP-EYMV ที่แยกบริสุทธิ์ไปฉีดเข้าสัตว์ทดลองจะทำให้ antigenic determinant ของโปรตีน CP-EYMV ยังคงเหมือนเดิม

4. การตรวจสอบโปรตีนและวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAGE

เมื่อนำโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานตามวิธีของ Bradford (1976) โดยเปรียบเทียบกับ Bovine serum albumin, Sigma (BSA) ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน ตรวจสอบบน 15% SDS–PAGE พบว่าสารละลายโปรตีนที่ได้นั้นมีความเข้มข้นประมาณ 1.2 มก./มล.

5. การผลิตแอนติซีรัมในสัตว์ทดลองและทดสอบคุณภาพ

ภายหลังการเจาะเลือดจากใบหูกระต่ายครั้งละประมาณ 20-30 มล. เพื่อนำไปปั่นและเก็บซีรั่ได้แอนตซีรั่มครั้งละ 10-15 มล. แอนติซีรัมที่ได้แบ่งเก็บแช่แข็งที่ -20 °ซ ผลการตรวจคุณภาพของแอนตีซีรั่มที่ได้จาการเจาะเลือดจำนวน 5 ครั้ง พบว่า แอนตีซีรั่มจากการเจาะ

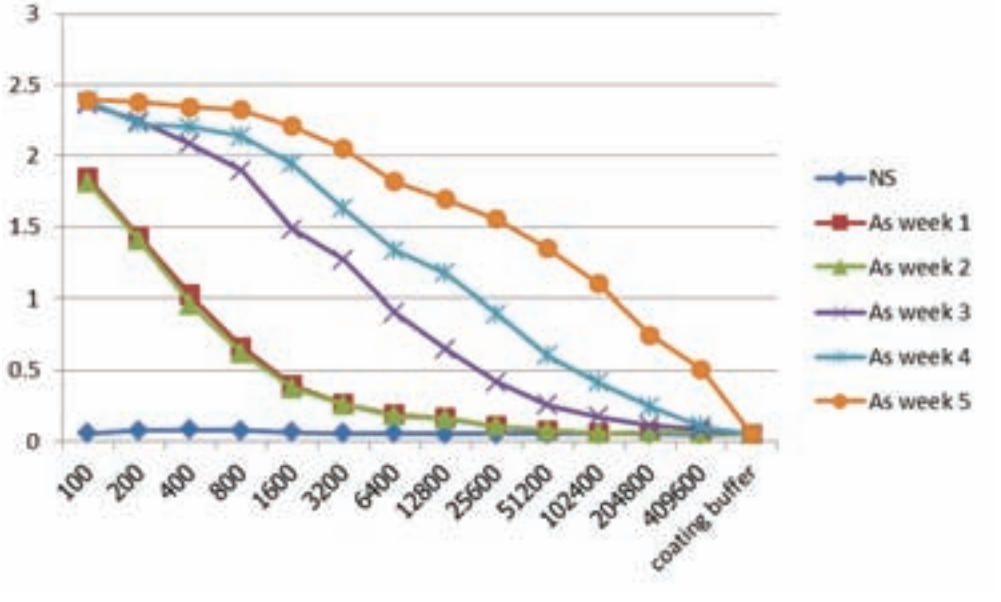

Figure 6 The antiserum titre of CP-EYMV antibody by Indirect ELISA at the highest concentration of 1:204800 with OD_{405} = 0.747

Notes: - the A_{405} average of the two measurements 60 minutes after addition of substrate.
- the A_{405} Examples of the more normal serum 3 times for a positive result.

Table 1 The efficiency of antibody (5 times of blood collection) reaction with antigen (CP-EYMV 1 mg/ml) testing by Indirect ELISA

Recombinant protein (ng/หลุม)	Antibody dilution											
	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200	102400	204800
Coating buffer	0.193	0.103	0.146	0.174	0.114	0.186	0.156	0.119	0.117	0.111	0.084	0.127
10000	3.644	3.63	3.614	3.599	3.650	3.635	3.592	3.552	3.419	3.026	2.304	1.471
1000	3.640	3.599	3.612	3.590	3.612	3.612	3.559	3.424	2.976	2.197	1.458	0.921
100	3.528	3.410	3.363	3.209	2.875	2.574	1.989	1.513	1.032	0.672	0.400	0.284
10	1.726	1.367	1.105	0.819	0.662	0.519	0.397	0.256	0.235	0.171	0.153	0.164
1	0.620	0.401	0.417	0.315	0.262	0.157	0.177	0.147	0.134	0.129	0.114	0.152
0.1	0.659	0.384	0.404	0.252	0.238	0.109	0.149	0.132	0.122	0.116	0.105	0.137

Notes: - the A_{405} average of the two measurements 60 minutes after addition of substrate.

- the A_{405} Examples of the more Coating buffer 3 times for a positive result.

Table 2 Optimum concentration of antiserum for detection of EYMV in infected plant by Indirect ELISA

The dilution of antibody	Antigen (Read on A_{405})			
	protein CP-EYMV	Eggplant (H)	EYMV (D)	Coating buffer
1:2,000	3.213	0.115	0.308	0.090
1:5,000	3.088	0.110	0.183	0.092
1:10,000	2.974	0.098	0.109	0.087

Notes: - the A_{405} average of the two measurements at 60 min after addition of substrate. H = Healthy, D = Diseases

นำหลอดที่ผสมปฏิกิริยามาใส่ในเครื่อง Thermal cycler เพื่อสังเคราะห์ DNA ตาม program ดังนี้ 94 °ซ 5 นาที จำนวน 1 รอบ Denature 94 °ซ 1 นาที จำนวน 1 รอบ Denature 94 °ซ นาน 1 นาที Annealing 50 °ซ นาน 1 นาที Extension 72 °ซ นาน 1 นาที 30 วินาที จำนาน 34 รอบ และ Final Extension 72 °ซ นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ใน TAE บัฟเฟอร์ เป็นเวลา 40 นาที

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

นำ PCR product ที่ได้จากข้อ 1.4 จำนวน 2 ไมโครลิตร ผสมกับโคลนนิ่งเวคเตอร์ pUC57 plasmid DNA 1 ไมโครลิตร และ salt solution 1 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 2 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เติม competent cell 50 ไมโครลิตร (*E. coli,* DH5α) แช่ในน้ำแข็ง นาน 30 นาที แล้วทำการ heat shock cell โดยการแช่หลอดในน้ำที่มีอุณหภูมิ 42 °ซ นาน 90 วินาที ก่อนย้ายไปแช่บนน้ำแข็งทันทีนาน 5 นาที เติมอาหาร 2XYT ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปเขย่าที่ 37 °ซ นาน 60 นาที แล้วดูดมา 5 ไมโครลิตร และเทแผ่ (spread) ลงบนอาหารแข็ง 2XYT Agar (ที่มี ampicillin 100 มก./ล.) บ่มที่ 37 °ซ ข้ามคืน

1.6 การสกัดโคลนของพลาสมิด และการเพิ่มจำนวนยีนโดยเทคนิค PCR

ใช้ไม้จิ้มฟันที่ปราศจากเชื้อคัดเลือกโคโลนีสีขาวบนอาหารแข็ง 2XYT โดยนำลงเลี้ยงในอาหารเหลว 2XYT (มี ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร ผสมอยู่) เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบ/นาที ที่ 37 °ซ ข้ามคืน นำเชื้อที่อยู่ในอาหารเหลว 1 มล. มาหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที 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) 3,000 ไมโครลิตร และ chloroform : isoamyl alcohol (24:1) 200 ไมโครลิตร เขย่าและแช่บนน้ำแข็งนาน 10 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอน ที่ 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที นำส่วนใสมาเติมด้วยหนึ่งเท่าโดยปริมาตรของ isopropanol และนำไปหมุนเหวี่ยง ที่ 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% ethanol และหมุนเหวี่ยงตกตะกอนอีกครั้ง ละลายตะกอนพลาสมิดด้วยน้ำที่มี RNase 2% ผสมอยู่ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่ 37 °ซ นาน 30 นาที นำพลาสมิดที่สกัดได้ส่งตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์และสังเคราะห์ DNA ในส่วนของ CP gene ตาม program PCR ในข้อ 1.4 และตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ใน TAE บัฟเฟอร์ เป็นเวลา 40 นาที

สมในการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน ปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นำตะกอนเซลล์มาผสมกับน้ำกลั่น (ตะกอน 1 ก./น้ำ 10 มล.) จากนั้นเติม lysozyme ปริมาณ 2 มก. ต่ออาหารเหลว 1 ล. กวนให้เข้ากันจนเหนียว เก็บที่ -20ซ ข้ามคืน แล้วเติม lysis buffer (Buffer B:50 mM NaH_2PO_4 H_2O, 10 mM Tris-HCl และ 8 M Urea, pH 8.0) ในอัตรา 50 มล./อาหารเหลว 1 ล. ทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator แบบ probe (power 45-50, cycle 50%) ครั้งละ 5 นาที จนของเหลวใส แล้วนำไปปั่นที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เก็บน้ำใสไปแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA Superflow (QIAGEN) (อัตรา 2 มล./อาหารเหลว 1 ล.) ล้าง Ni-NTA resin column หลังแพ็คแล้ว ด้วย buffer B จากนั้นเทส่วนน้ำใสให้ผ่าน column และล้าง column ด้วย buffer C (pH 6.3) และ buffer D (pH 5.9) ล้างชะโปรตีน recombinant ด้วย buffer E (pH 4.0) เพื่อแยกโปรตีนออกจากเจลใน column เก็บเป็น fractions หลอดละ 500 ไมโครลิตร เพื่อนำมาตรวจหาความบริสุทธิ์และขนาดของโปรตีนที่แยกได้ในแต่ละ fractions ด้วยเทคนิค SDS-PAGE นำโปรตีนบริสุทธิ์ทั้งหมดที่ได้ไปกำจัดเกลือด้วยวิธี dialysis ใน PBS แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Bradford's method (Bradford, 1976) และขนาดของโปรตีนอีกครั้ง

4. การตรวจสอบโปรตีนและวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAGE

4.1 การเตรียมตัวอย่างโปรตีนตรวจสอบใน SDS-PAGE

เตรียมเจล SDS ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยเตรียมเจลระหว่างแผ่นกระจกสองแผ่น ประกบแผ่นกระจกเข้าด้วยกันโดยใช้ spacer หนา 1 มม. คั่นกลางระหว่างแผ่นกระจกและตรวจดูเพื่อไม่ให้มีรอยรั่ว เตรียม เจลที่ใช้แยกโปรตีนจากตัวอย่าง (15% separating gel) โดยใช้ 15% Polyacylamide นำตัวอย่างโปรตีนที่เก็บได้ในข้อ 3 มาอย่างละ 1 มล. ปั่นตะกอนเซลล์ เทส่วนใสทิ้งและนำตะกอนเซลล์มาละลายในน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 2X sample solubilizing buffer (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% (w/v) SDS, 5% (v/v) β-mercaptoethanol และ 0.02% (w/v) bromophenol blue, 15% (v/v) glycerol) 50 ไมโครลิตร นำตัวอย่างไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที และแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที ใช้โปรตีนมาตรฐาน (Fermentas®, UK) ในการเปรียบเทียบขนาด จำนวน 12 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปแยกในสนามไฟฟ้าเป็นเวลา 3 ชม. ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 30-45 นาที ในการแยกโปรตีนในเจลส่วนบนเจลล่างใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 2 ชม.

เลือดครั้งที่ 3-5 มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยทำปฏิกิริยาได้ 1: 204,800 (Figure 6)

6. การทดสอบประสิทธิภาพความจำเพาะของแอนติซีรัม CP-EYMV ที่ผลิตได้

6.1 การทดสอบประสิทธิภาพและตรวจสอบโรคใบด่างของมะเขือ โดยวิธี Indirect ELISA

การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่ได้จากการเจาะเลือดครั้งที่ 5 ทำปฏิกิริยากับแอนติเจน (โปรตีน CP-EYMV 1 มก./มล.) เพื่อตรวจสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแอนติบอดีที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่ความเข้มข้นต่ำสุดได้ ด้วยวิธี Indirect ELISA พบว่า แอนติซีรัมที่ความเข้มข้น 1:25,600 สามารถตรวจแอนติเจน (recombinant protein) ได้ต่ำสุดที่ประมาณ 100 นาโนกรัม (Table 1) และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมกับตัวอย่างใบมะเขือที่แสดงอาการด่าง และใบมะเขือปกติ พบว่า แอนตี้ซีรั่มความเข้มข้น 1:2000 เกิดปฏิกิริยาได้ดี สามารถอ่านค่าความดูดกลืนแสง absorbance ของใบมะเขือที่เป็นโรคที่แสดงอาการด่างได้ชัดเจน เมื่อเทียบกับค่าที่อ่านได้จากใบมะเขือปกติ (Table 2) ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นบวก เกิดสีเหลืองชัดเจน ทำให้สามารถอ่านผลความแตกต่างระหว่างใบมะเขือที่เป็นโรคและใบมะเขือที่ปกติได้

6.2 การตรวจสอบโรคใบด่างของมะเขือ โดยวิธี NCM-ELISA

การตรวจสอบโรคใบด่างของมะเขือโดยวิธี NCM-ELISA พบว่าหลังจากนำแอนติซีรัมของ CP-EYMV ไปสกัด IgG สามารถใช้ IgG ของ EYMV-CP มาตรวจตัวอย่างมะเขือยาวที่เป็นโรค ได้ความเข้มข้น ตั้งแต่ 1:10-1:80 โดยให้ปฏิกิริยาชัดเจนกับ IgG ของ EYMV-CP เมื่อตรวจกับ Healthy plant, Infected plant, Healthy plant+recombinant protein,

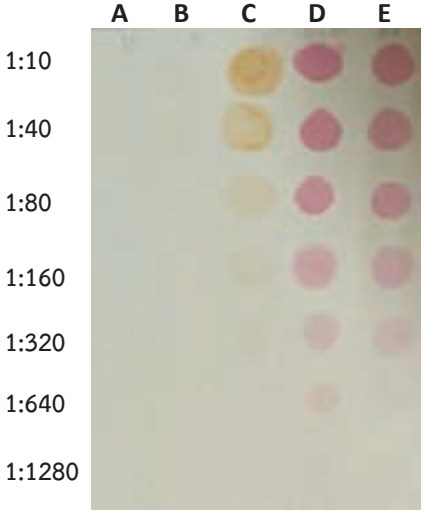

Figure 7 ELISA on nitrocellulose membranes (NCM-ELISA) to detect EYMV-coat protein in tomato leaves. (A) Buffer (B) Healthy plant (C) Infected plant (D) recombinant protein and (E) Healthy plant + recombinant protein

recombinant protein และ Buffer พบว่าให้ปฏิกิริยาเป็นลบเมื่อใช้ตรวจกับพืช Healthy plant และเป็นบวกเมื่อตรวจกับ Infected plant (Figure 7)

สรุปผลการทดลอง

การผลิตแอนติซีรัมของเชื้อ EYMV ใน

สัตว์ทดลองด้วยการใช้ recombinant protein EYMV-CP ด้วยการสกัดดีเอ็นเอของ EYMV จากใบมะเขือเปราะที่เป็นโรคใบด่าง โดยวิธีสกัดพลาสมิดมาสังเคราะห์เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส สังเคราะห์ได้ชิ้นของดีเอ็นเอ ขนาด 777 คู่เบส สามารถนำไปโคลนเข้าสู่เวคเตอร์ pET200/D-TOPO® (Invitrogen) คัดเลือกโคลนที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ในเซลล์ของ E. coli BL 21 (DES 3) นำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณ ในอาหาร 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin 50 มก./ล. ใช้สาร Isopropyl-β-D thiogalactopyranoside (IPTG) ชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนสูงสุดที่ระยะเวลา 24 ชม. โดยให้โปรตีนที่มีขนาดประมาณ 28 กิโลดาลตัน โปรตีนที่ได้สามารถใช้เป็นแอนติเจนฉีดกระต่าย ในการผลิตแอนตีซีรั่มต่อ CP-EYMV มีค่า titer สูงสุดที่ 1:204800 แอนตีซีรั่มที่ผลิตได้นี้สามารถนำไปใช้ในการตรวจเชื้อ EYMV ในตัวอย่างใบมะเขือเปราะที่เป็นโรคใบด่างโดยวิธี Indirect ELISA และ วิธี NCM ELISA ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และแม่นยำ

คำขอบคุณ

ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการที่สนับสนุนทุนวิจัย

เอกสารอ้างอิง

กิตติ วงส์พิเชษฐ. 2555. *วิทยาการเมล็ดพันธุ์พืชไร่: เรื่องโครงสร้างกล้า เมล็ดหรือผลและดอก พืชบางชนิด.* ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

ลำพึง เรียงวงษ์ สุภาภรณ์ เอี่ยมแช่ง และอรวรรณ ชัชวาลการพาณิชย์. 2547. การสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสเส้นใบเหลืองกระเจี๊ยบเขียวในระบบเซลล์แบคทีเรีย. รายงานการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. 3-6 กุมภาพันธ์ 2547. หน้า 110-117.

ศุภลักษณ์ ฮอกะวัต. 2536. *โรคผักตระกูลพริกและมะเขือเทศ.* ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

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.

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

Mansour, A. and A. Al-Musa. 1992. Tomato yellow leaf curl virus: host range and virus-vector relationship. *Plant Pathol.* 41: 122-125.

Morin, S., M. Ghanim, M. Zeidan, H. Czosnek, M. Verbeek and J. F. J. M van den Heuvel. 1999. A GroEL homologue from endosymbiotic of the whitefly Bemisia tabaci is implicated in the circulative transmission of tomato yellow leaf curl virus. *Virology.* 256:75-84.

Osmar Nickel, 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.

Rybicki, E.P., Briddon, R.w., Brown, J.E., Fauquet, C.M., Maxwell, D.P., Harrison, B.D., Markham, P.G., and Stanley, J. 2000. Geminviridae. PP. 285-297. *In: Virus Taxonomy, M.H.V. Van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E. Carstens, M.K. Esets, S. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D. McGeoch, C.R. Pringle and R.B.Wickner(ed), Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of viruses.* Academic Press, New York.