



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การศึกษาลักษณะทางชีวโมเลกุลของยีนและโปรตีน Nucleocapsid และ Non-Structural
ของ Melon yellow spot virus ที่เข้าทำลายเมลอนในประเทศไทย

Molecular Characterization of Nucleocapsid and Non-Structural Genes and Proteins of
Melon yellow spot virus Infecting Melon in Thailand

นามผู้วิจัย นางสาวณัฐชนันท์ วิบูลย์โชติกร

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พิศสุวรรณ เจริญสมบัติ, Dr.Agr.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์รัชณี สงประยูร, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครชนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาลักษณะทางชีวโมเลกุลของยีนและโปรตีน Nucleocapsid และ Non-Structural
ของ Melon yellow spot virus ที่เข้าทำลายเมลอนในประเทศไทย

Molecular Characterization of Nucleocapsid and Non-Structural Genes and Proteins of
Melon yellow spot virus Infecting Melon in Thailand

โดย

นางสาวณัฐชนันท์ วินุลย์โชติกร

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ณัฐนันท์ วิบูลย์โชติกร 2555: การศึกษาลักษณะทางชีวโมเลกุลของโปรตีน Nucleocapsid และ Non-Structural ของ Melon yellow spot virus ที่เข้าทำลายเมลอนในประเทศไทย ปรินญาวิทยา ศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการ ระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์พิศสุวรรณ เข็มสมบัติ, Dr.Agr. 71 หน้า

Melon yellow spot virus (MYSV) เป็นไวรัสสาเหตุโรคพืชที่จัดอยู่ในจีโนมทอสพอไวรัส เข้าทำลายพืชในวงศ์แตง ทำให้ปริมาณผลผลิตลดลงและเสียคุณภาพ ในประเทศไทยมีการผลิตและใช้แอนติซีรัมเพื่อตรวจสอบทอสพอไวรัสหลายชนิด แต่มักพบการทำปฏิกิริยาข้ามชนิดกัน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาโปรตีน non-structural (NSs) เพื่อใช้ประโยชน์ในการผลิตแอนติซีรัมสำหรับตรวจสอบเชื้อ MYSV เก็บตัวอย่างพืช 5 ชนิดที่แสดงอาการใบจุดประหลาดจากแปลงปลูกในจังหวัดนครปฐม นครราชสีมา และเพชรบุรี จำนวน 321 ตัวอย่าง ตรวจสอบเชื้อ MYSV ใน 111 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค DAC-ELISA และเก็บตัวอย่างจากจังหวัดกาญจนบุรีและนครราชสีมา ตรวจสอบเชื้อ 20 ตัวอย่าง จาก 29 ตัวอย่าง เลือกตัวอย่างเชื้อไอโซเลท SUT ซึ่งแยกได้จากเมลอนมาใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับความคุ้มกันการสังเคราะห์โปรตีน nucleocapsid (N) และ non-structural (NSs) โดยออกแบบไพรเมอร์และสังเคราะห์ดีเอ็นเอของยีน N และ NSs ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่ายีน N มีขนาด 840 นิวคลีโอไทด์ แปรรหัสได้กรดอะมิโน 280 เรซิดิวส์ มีน้ำหนักโมเลกุล 31.159 กิโลดาลตัน มีความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนกับเชื้อ MYSV ไอโซเลท W3-Kalasin และ Ph122 ซึ่งพบในแตงโมและโทงเทงจากประเทศไทย และ Tospo-melo ซึ่งพบในเมลอนจากประเทศญี่ปุ่นมากที่สุดที่ระดับ 100 เปอร์เซ็นต์ ยีน NSs มีขนาด 1,410 นิวคลีโอไทด์ แปรรหัสได้กรดอะมิโน 470 เรซิดิวส์ มีน้ำหนักโมเลกุล 53.169 กิโลดาลตัน มีความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนกับเชื้อ MYSV ไอโซเลท TW ซึ่งพบในแตงโมจากประเทศไต้หวันมากที่สุดที่ระดับ 97.7 เปอร์เซ็นต์ โคลนยีน NSs เข้ากับพลาสมิดพาหะของ pQE expression system เพื่อสังเคราะห์โปรตีน NSs ในสภาพหลอดทดลองในเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* ได้โปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 54.764 กิโลดาลตัน มีความเข้มข้น 1.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้เป็นแอนติเจนฉีดกระต่าย โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน 6xHis-NSs ที่ผลิตได้ (Pab-MYSV-NSs) มีค่าไตเตอร์อยู่ในช่วง 800-3,200 ทำปฏิกิริยากับเชื้อ MYSV ในใบแตงร้านเมื่อทดสอบด้วย DAC-ELISA และทำปฏิกิริยากับเชื้อ MYSV ในใบแตงร้านและใบเมลอน เมื่อทดสอบด้วย Dot immunobinding assay (DIBA) โดยไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV), *Capsicum Chlorosis virus* (CaCV) และ *Tomato necrotic ringspot virus* (TNRV)

Nutchanan Wiboonchotikorn 2012: Molecular Characterization of Nucleocapsid and Non-Structural Genes and Proteins of Melon yellow spot virus Infecting Melon in Thailand. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Assistant Professor Pissawan Chiemsombat, Dr.Agr. 71 pages.

Melon yellow spot virus (MYSV) is a distinct plant virus species in the genus *Tospovirus* which infects cucurbitaceous plants. The virus causes low yield and low quality of the produces. In Thailand there have been several antisera raised against tospoviruses but most of them cross-reacted to the related tospovirus species. This research aimed to investigate MYSV nucleocapsid (N) and non-structural (NSs) genes and proteins, and the in vitro-expressed NSs protein would be applied to produce antibody for specific MYSV diagnosis. Symptomatic plant samples showing yellow spots on leaves were collected in Nakhonpathom, Nakhonratchasima and Phetchaburi provinces. MYSV was detected from 111 out of 321 samples by using ELISA. Twenty nine plant samples were collected from Kanchanaburi and Nakhonratchasima provinces and 20 melon samples were found to be infected. Isolate SUT from melon was selected to study on MYSV N and NSs genes and proteins. Primers were designed for viral genes amplification by RT-PCR and gene sequences were analyzed. The obtained N gene comprised 840 nucleotides encoded for 280 amino acid polypeptide MW of 31.159 kDa. The N protein sequence was similar to Thai MYSV-W3 from watermelon, MYSV-Ph112 from *Physalis* plant, including Tospo-melo isolates from Japan at 100% identity. The NSs gene contained 1410 nucleotides which coded for 470 amino acid residues of MW53.169 kDa polypeptide. The NSs protein sequence showed the highest identity to MYSV-TW isolate from watermelon in Taiwan. Subsequently, MYSV-SUT NSs gene was cloned into the expression vector in pQE expression system and the recombinant 6xHis-NSs protein synthesized in vitro was obtained. The purified NSs protein has MW of 54.764 kDa and was used at conc.1.6 mg/ml for rabbit immunization. Polyclonal antibody against recombinant NSs protein (PAb-MYSV-NSs) revealed titer ranges of 800-3200 by DAC-ELISA, and specifically reacted to MYSV-infected cucumber leaf sap. By using Dot immunobinding assay, PAb-MYSV-NSs can detect MYSV in cucumber and melon leaf sap without cross-reaction to diseased plant sap of *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV), *Capsicum chlorosis virus* (CaCV), or *Tomato necrotic ring spot virus* (TNRV).

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ผศ.ดร. พิศสุวรรณ เจียมสมบัติ ประธาน
กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างสูงยิ่ง ที่กรุณาให้ความรู้ ให้คำปรึกษาวิธีการดำเนินการวิจัย
และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของวิทยานิพนธ์ รวมทั้งช่วยเหลือในด้านอื่นๆ เสมอมา ขอกราบ
ขอบพระคุณกรรมการที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ผศ.ดร. รัชนิ์ องประยูร ที่ให้ความกรุณา
ตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา
และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สบว) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
กระทรวงศึกษาธิการที่ให้การสนับสนุนการจ้างเป็นบัณฑิตผู้ช่วยวิจัยและสนับสนุนงบประมาณใน
การทำวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณ พี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และเป็น
กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์เสมอมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ รวมทั้งทุกคนในครอบครัวที่คอยเป็น
กำลังใจ ให้คำปรึกษา ให้การส่งเสริมในด้านการศึกษา และการทำวิทยานิพนธ์แก่ข้าพเจ้าด้วยดี
เสมอมา

ณัฐชานันท์ วิบูลย์โชติกร
มีนาคม 2555

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(7)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	11
ผลและวิจารณ์	22
สรุป	55
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	57
ภาคผนวก	65
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	71

สารบัญตาราง

ตารางที่	เนื้อหา	หน้า
1	เชื้อทอสปอไวรัส ไอโซเลท พืชอาศัย สถานที่พบ ชื่อยีน และ accession number ของยีน Nucleocapsid (N) และ Non-Structural (NSs) ที่ใช้ในการวิเคราะห์ร่วมกับเชื้อ Melon yellow spot virus (MYSV) ที่ศึกษาครั้งนี้	20
2	ผลการตรวจสอบเชื้อ Melon yellow spot virus (MYSV) ในตัวอย่างแตงกวา และแตงร้าน (<i>Cucumis sativus</i>) แตงโม (<i>Citrullus lanatus</i>) โทงเทง (<i>Physalis angulata</i>) และพริก (<i>Capsicum annuum</i>) ที่เก็บจากแปลงปลูกโดยใช้แอนติบอดี PAb-Tospo A1-N และ PAb-MYSV6-N วิเคราะห์ด้วยเทคนิค DAC-ELISA	22
3	ผลการตรวจสอบเชื้อ Melon yellow spot virus (MYSV) ในตัวอย่างเมลอน (<i>Cucumis melo</i>) และแตงร้าน (<i>Cucumis sativus</i>) ที่เก็บจากโรงเรือนในจังหวัดนครราชสีมาและแปลงปลูกของบริษัทโคลส (ประเทศไทย) จำกัด โดยใช้แอนติบอดี PAb-Tospo A1-N, PAb-MYSV6-N และ MAb-5E7-N วิเคราะห์ด้วยเทคนิค DAC-ELISA	24
4	เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีนและโปรตีน Nucleocapsid (N) ของเชื้อ Melon yellow spot virus ไอโซเลท SUT (MYSV-SUT) กับเชื้อ Melon yellow spot virus ไอโซเลทต่างๆ ที่พบในประเทศไทย, ญี่ปุ่น และไต้หวัน เปรียบเทียบแบบ Multiple alignment ด้วยโปรแกรม CLC Main Workbench 5 (CLC bio)	32
5	เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีนและโปรตีน Nucleocapsid (N) ของเชื้อ Melon yellow spot virus ไอโซเลท SUT (MYSV-SUT) กับเชื้อทอสปอไวรัสไอโซเลทต่างๆ ที่พบในประเทศไทย, ญี่ปุ่น และไต้หวัน เปรียบเทียบแบบ Multiple alignment ด้วยโปรแกรม CLC Main Workbench 5 (CLC bio)	33

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
6	เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีนและโปรตีน Non-Structural (NSs) ของเชื้อ Melon yellow spot virus ไอโซเลท SUT (MYSV-SUT) กับเชื้อทอสโปไวรัสไอโซเลทต่างๆ ที่พบในประเทศไทย, ญี่ปุ่น และไต้หวัน เปรียบเทียบแบบ Multiple alignment ด้วยโปรแกรม CLC Main Workbench 5 (CLC bio)	34
7	การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีนและโปรตีน Nucleocapsid (N) และ Non-Structural (NSs) ของเชื้อ Melon yellow spot virus ไอโซเลท SUT (MYSV-SUT) กับเชื้อทอสโปไวรัสไอโซเลทต่างๆ ที่พบในประเทศไทย ญี่ปุ่น และไต้หวัน	35
8	ค่าความเจือจางสูงสุด (dilution end point) ของแอนติซีรัม PAb-MYSV-NSs ที่ทำปฏิกิริยากับโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs ความเข้มข้น 3 µg/ml ซึ่งเป็นแอนติเจน ตรวจสอบด้วยเทคนิค DAC-ELISA	41
9	ผลของปฏิกิริยาจำเพาะของแอนติซีรัมต่อโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs ของเชื้อ MYSV-SUT จากการเจาะเลือดครั้งที่ 4 (PAb-MYSV-NSs4) ที่เจือจาง 1:500 เท่า และแอนติซีรัมต่อโปรตีน N ของเชื้อ Melon yellow spot virus (PAb-MYSV6-N) ที่เจือจาง 1:1,000 เท่า กับตัวอย่างโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs และนำคั่นไบฟิซเป็นโรคบนแผ่น nitrocellulose membrane วิเคราะห์ด้วยวิธี Dot immunobinding assay (DIBA)	48

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า	
1	แผนภาพจำลองโครงสร้างสายพันธุกรรม S RNA ของเชื้อ Melon yellow spot virus ไอโซเลท Tospo-melo (MYSV-Tospo-melo) ขนาด 3232 นิวคลีโอไทด์	13
2	อาการผิดปกติบนตัวอย่างใบเมลอนจากโรงเรือนในจังหวัดนครราชสีมา (ก) และแปลงปลูกของบริษัทโคลส (ประเทศไทย) จำกัด (ข) ที่ตรวจพบเชื้อ Melon yellow spot virus ด้วยเทคนิค DAC-ELISA โดยใช้แอนติบอดี PAb-MYSV6-N และ MAb-5E7-N	23
3	แผนภาพแสดงตำแหน่งและขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จาก RNA รวมของพืชที่ติดเชื้อ Melon yellow spot virus (MYSV) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน Nucleocapsid (N) และ Non-Structural (NSs)	26
4	เจลแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 852 คู่เบส ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน N ของเชื้อ Melon yellow spot virus ไอโซเลท MYSV-SUT ด้วยเทคนิค two-step RT-PCR ใช้ไพรเมอร์ MYSV-CP-F และ MYSV-CP-R และใช้อาร์เอ็นเอรวมจากใบเมลอนเป็นต้นแบบ แยกขนาดดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis	27
5	เจลแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 1,452 คู่เบส ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน NSs ของเชื้อ Melon yellow spot virus ไอโซเลท MYSV-SUT ด้วยเทคนิค two-step RT-PCR ใช้ไพรเมอร์ MYSV-NSs3-F และ MYSV-NSs1-R และใช้อาร์เอ็นเอรวมจากใบเมลอนเป็นต้นแบบแยกขนาดดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis	28
6	Phylogenetic tree ของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Nucleocapsid (N) ของเชื้อ Melon yellow spot virus ไอโซเลท SUT (MYSV-SUT) กับเชื้อทอสโปไวรัส ไอโซเลทต่างๆ ที่พบในประเทศไทย (THA) ญี่ปุ่น (JPN) และไต้หวัน (TWN) โดยใช้การวิเคราะห์แบบ UPGMA ด้วยโปรแกรม CLC Main Workbench 5 (CLC bio) คำนวณค่า Bootstrap percentage จาก 1,000 Replications	36

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
7	Phylogenetic tree ของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Non-Structural (NSs) ของเชื้อ Melon yellow spot virus ไอโซเลท SUT (MYSV-SUT) กับเชื้อทอสโปไวรัสไอโซเลทต่างๆ ที่พบในประเทศไทย(THA) ญี่ปุ่น (JPN) และไต้หวัน (TWN) โดยใช้การวิเคราะห์แบบ UPGMA ด้วยโปรแกรม CLC Main Workbench 5 (CLC bio) คำนวณค่า Bootstrap percentage จาก 1,000 replications	36
8	เจลแสดงแถบโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs ของเชื้อ Melon yellow spot virus ไอโซเลท SUT (MYSV-SUT) ที่สังเคราะห์ได้ในเซลล์ <i>E. coli</i> DH5 α เมื่อสกัดโปรตีนจากเซลล์ <i>E. coli</i> ในสภาวะ denaturing condition และทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยผ่าน Ni-NTA column ตรวจสอบด้วย 12% SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis ย้อมสีด้วย staining solution (0.2% Coomassie brilliant blue R250) และล้างออกด้วย Destaining solution จนกว่าจะเห็นแถบโปรตีน	38
9	Calibration curve ที่สร้างขึ้นจากระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่ (cm) และค่า $\log_{10}$ ของน้ำหนักโมเลกุล (kDa) ของโปรตีนมาตรฐาน (Fermentas) SM0431 แยกขนาดโปรตีนด้วย 12% SDS Polyacrylamide gel electrophoresis และโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs เคลื่อนที่ได้ระยะทาง 1.85 cm ซึ่งเทียบกับค่า $\log_{10}$ ของน้ำหนักโมเลกุลได้ประมาณ 1.7385 คำนวณน้ำหนักโมเลกุลได้ประมาณ 54.764 kDa	39
10	Standard curve ที่สร้างขึ้นจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm ของโปรตีน BSA ที่ทราบความเข้มข้น (ตั้งแต่ 0.0625-2 mg/ml) วัดด้วยวิธี Bradford's เพื่อหาความเข้มข้นของโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs ที่แยกให้บริสุทธิ์ ซึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 0.561 คิดเป็นความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 1.6 mg/ml	40
11	กราฟแสดงค่าไตเตอร์ของแอนติซีรั่มต่อโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs (PAb-MYSV-NSs) จากการเจาะเลือด 5 ครั้ง (AS1-AS5) ใช้โปรตีน 6xHis-NSs ความเข้มข้น 3 μ g/ml เป็นแอนติเจนตรวจสอบด้วยเทคนิค DAC-ELISA วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm หลังจากเติม substrate นาน 60 นาที	42

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
12 ผลการทำปฏิกิริยาของแอนติซีรัมต่อโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs ของเชื้อ MYSV-SUT จากการเจาะเลือดครั้งที่ 4 (PAb-MYSV-NSs4) ที่เจือจาง 1:500 เท่า กับโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs และน้ำคั้นใบพืชเป็นโรค ด้วยเทคนิค DAC-ELISA วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm หลังจากเติม substrate นาน 60 นาที	45
13 ผลการทำปฏิกิริยาของแอนติซีรัมต่อโปรตีน N ของเชื้อ Melon yellow spot virus (PAb-MYSV6-N) ที่เจือจาง 1:1,000 เท่ากับโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs และน้ำคั้นใบพืชเป็นโรค ด้วยเทคนิค DAC-ELISA วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm หลังจากเติม substrate นาน 60 นาที	46
14 ตะกอนสีม่วงบนแผ่น nitrocellulose membrane แสดงผลของปฏิกิริยาจำเพาะของแอนติซีรัมกับตัวอย่างโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs และน้ำคั้นใบพืชเป็นโรค วิเคราะห์ด้วยวิธี Dot immunobinding assay (DIBA)	47
15 ผลการทำปฏิกิริยาของแอนติซีรัมต่อโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs และน้ำคั้นใบพืชเป็นโรคด้วยเทคนิค DAC-ELISA วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm หลังจากเติม substrate นาน 60 นาที	50
16 แผนผังขั้นตอนการตรวจวินิจฉัยเพื่อจำแนกเชื้อทอสปอไวรัส 4 ชนิด ที่พบในประเทศไทยในพืชวงศ์แตงด้วยเทคนิค DAC-ELISA และ DIBA	53
17 แผนผังขั้นตอนการตรวจวินิจฉัยเพื่อจำแนกเชื้อทอสปอไวรัส 4 ชนิด ที่พบในประเทศไทยในพืชที่ไม่ใช่วงศ์แตงด้วยเทคนิค DAC-ELISA และ DIBA	54

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

MYSV	=	Melon yellow spot virus
WSMoV	=	<i>Watermelon silver mottle virus</i>
CaCV	=	Capsicum chlorosis virus
TNRV	=	Tomato necrotic ringspot virus
N	=	Nucleocapsid
NSs	=	Non-Structural
PAb	=	Polyclonal antibody
MAb	=	Monoclonal antibody
6xHis-NSs-MYSV	=	โปรตีน Non-Structural ถูกผสมของเชื้อ Melon yellow spot virus
PAb-MYSV-NSs	=	โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน NSs ของ MYSV
PAb-MYSV-N	=	โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน N ของ MYSV
PAb-Tospo A1-N	=	โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน N ของเชื้อทอสปอไวรัส ซีโรกรุ๊ป IV
PAb-CaCV-NSs	=	โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน NSs ของ CaCV
PAb-TNRV-N	=	โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน N ของ TNRV
DAC-ELISA	=	Direct antigen coating-Enzyme Linked Immunosorbant Assay
DIBA	=	Dot immunobinding assay
<i>E.coli</i>	=	<i>Escherichia coli</i>
His	=	Histidine
nm	=	Nanometer
mg	=	Milligram
µg	=	Microgram
ml	=	Milliliter
µl	=	Microliter
MW	=	Molecular weight

**การศึกษาลักษณะทางชีวโมเลกุลของยีนและโปรตีน Nucleocapsid และ
Non-Structural ของ Melon yellow spot virus ที่เข้าทำลายเมลอนในประเทศไทย**

**Molecular Characterization of Nucleocapsid and Non-Structural Genes and
Proteins of Melon yellow spot virus Infecting Melon in Thailand**

คำนำ

Melon yellow spot virus (MYSV) เป็นเชื้อทอสมะพร้าวไวรัสที่สร้างความเสียหายอย่างมากให้กับพืชในวงศ์แตง โดยจะทำให้ผลผลิตลดลงทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ จากการศึกษาพบว่าการแพร่ระบาดของเชื้อ MYSV ครอบคลุมพื้นที่ปลูกพืชวงศ์แตงในประเทศไทย ญี่ปุ่นและไต้หวัน เชื้อสามารถแพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็วโดยอาศัยเพลี้ยไฟเป็นพาหะ ทำให้ยากต่อการควบคุม การตรวจวินิจฉัยพืชที่คาดว่าติดเชื้อทอสมะพร้าวไวรัสจึงเป็นสิ่งจำเป็นในการศึกษาการแพร่ระบาดและการควบคุมโรค และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในแง่การคัดเลือกพันธุ์ต้านทานได้ด้วย

การตรวจวินิจฉัยพืชเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสสามารถทำได้หลายวิธี วิธีการทางอิมมูโนวิทยาเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยใช้แอนติซีรั่มที่มีความจำเพาะต่อเชื้อที่จะตรวจ ดังนั้นแอนติซีรั่มจึงต้องมีประสิทธิภาพ เพื่อประโยชน์ในการจำแนกเชื้อไวรัสได้อย่างแม่นยำ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการตรวจวินิจฉัยโรคที่เกิดจากเชื้อทอสมะพร้าวไวสนิยมใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน Nucleocapsid (N) ในการตรวจสอบพืชเป็นโรค ทั้งที่เป็น โมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb) และโพลีโคลนอลแอนติบอดี (PAb) ซึ่งพบว่ามักเกิดปัญหาการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อทอสมะพร้าวไวรัสในซีโรกรุ๊ปเดียวกัน ปัจจุบันจึงมีการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีน Non-structural (NSs) ในแง่ของการใช้ประโยชน์ทางซีรั่มวิทยาเพิ่มมากขึ้น เพื่อแก้ปัญหการเกิดปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีต่อโปรตีน N ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีน NSs ของเชื้อต่างชนิดกันมีความแตกต่างกันของลำดับกรดอะมิโนมากกว่าโปรตีน N ทำให้แอนติบอดีต่อโปรตีน NSs มีแนวโน้มว่าอาจไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อทอสมะพร้าวไวรัสชนิดอื่น

สำหรับประเทศไทยนั้นพบว่ามีรายงานการศึกษายีนและโปรตีน N ของเชื้อ MYSV รวมถึงการผลิต MAb และ PAb ต่อโปรตีน N ของเชื้อ MYSV เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยพืชเป็นโรค แต่ยังไม่มีการศึกษายีนและโปรตีน NSs ไม่มากนัก งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีนและโปรตีน N และ NSs ของเชื้อ MYSV ที่แยกได้จากเมลอน วิเคราะห์สาย

สัมพันธ์กับไอโซเลตอื่นๆ และเชื้อทอสปลาสมาชนิดอื่นที่พบในประเทศไทย ผลิตและตรวจสอบ
คุณสมบัติของแอนติบอดีต่อโปรตีน NSs สำหรับนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยและจำแนกเชื้อ
MYSV ในพืชเป็นโรค



วัตถุประสงค์

1. ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีนและโปรตีน Nucleocapsid (N) และ Non-Structural (NSs) ของเชื้อ Melon yellow spot virus (MYSV) สาเหตุโรคน้ำใบจุดเหลืองของเมลอน
2. ศึกษาสายสัมพันธ์ของเชื้อ MYSV ไอโซเลตต่างๆ จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน N และ NSs
3. สังเคราะห์โปรตีน NSs ในสภาพหลอดทดลอง และผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน NSs
4. ทดสอบความจำเพาะต่อการตรวจสอบเชื้อ MYSV ด้วยโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน NSs ที่ผลิตได้

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทั่วไปของเชื้อ Melon yellow spot virus (MYSV)

Melon yellow spot virus (MYSV) เป็นไวรัสโรคพืชที่จัดจำแนกอยู่ใน Family *Bunyaviridae* Genus *Tospovirus* พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1992 ในประเทศญี่ปุ่น โดยทำให้เกิดอาการ yellow spot และ chlorosis อย่างรุนแรงในเมลอน (*Cucumis melo*) (Kato *et al.*, 2000) เชื้อ MYSV มีพืชอาศัยหลายชนิด โดยมีรายงานว่าสามารถเข้าทำลายพืชในวงศ์ *Cucurbitaceae* เช่น แตงร้าน แตงโม แคนตาลูป มะระ และเมลอน (Gajanandana *et al.*, 2006; Chiemsombat *et al.*, 2008; Takeuchi *et al.*, 2009) เชื้อ MYSV พบในประเทศญี่ปุ่น ไต้หวัน และไทย (David, 2005; Chen *et al.*, 2008; Chiemsombat *et al.*, 2008) ทำให้เกิดอาการ chlorotic spot, mosaic mottling, yellowing บนใบของพืชอาศัย อาการ mosaic patches หรือ mottling บนผล ซึ่งอาการต่างๆเหล่านี้เป็นสาเหตุทำให้ผลผลิตของพืชลดลงทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ (Sugiyama *et al.*, 2009)

1.1 สันฐานวิทยา

อนุภาคของเชื้อ MYSV มีรูปร่างเป็นแบบทรงกลม (quasi-spherical) ขนาดของอนุภาคมีความแตกต่างกันในแต่ละไอโซเลต มีการศึกษาพบว่าอนุภาคของเชื้อ MYSV ที่เข้าทำลายพืชวงศ์ แตงในญี่ปุ่นมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 114-176 นาโนเมตร (Okuda *et al.*, 2002) ส่วน MYSV ที่เข้าทำลายมะระในญี่ปุ่นมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 130-200 นาโนเมตร (Takeuchi *et al.*, 2009) และ MYSV ไอโซเลต TW-C1 ที่เข้าทำลายแตงในไต้หวันมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาคประมาณ 70-110 นาโนเมตร (Chao *et al.*, 2010) อนุภาคไวรัสมีส่วนของเยื่อหุ้ม (envelope) ซึ่งประกอบไปด้วยชั้นไขมัน (lipid membrane) และไกลโคโปรตีน (glycoprotein) 2 ชนิด คือ G1 และ G2 ซึ่งมีลักษณะเป็นปุ่ม (spikes) อยู่บนเยื่อหุ้ม (German *et al.*, 1992)

1.2 โครงสร้างและสารพันธุกรรม

ภายในอนุภาคของ MYSV มีหน่วยพันธุกรรม 3 โมเลกุล (tripartite) เป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded RNA: ssRNA) ประกอบด้วย L-RNA มีขนาดประมาณ 8.9 kb M-RNA ขนาดประมาณ 4.8 kb และ S-RNA ขนาดประมาณ 3.2 kb โดยแต่ละโมเลกุลมีโปรตีนห่อหุ้มซึ่งเรียกว่า nucleocapsid protein (N-protein) ส่วนมากจะกระจัดกระจายอยู่ในไซโตพลาซึมของเซลล์

ที่ถูกเข้าทำลาย (Kato *et al.*, 2000; Okuda *et al.*, 2004; 2006) จีโนมทั้ง 3 ชั้นมีรหัสที่กำหนดการสร้างโปรตีน 5 ชนิด คือ nucleocapsid protein (N protein), nonstructural protein (NSs protein), movement protein (NSm protein), viral polymerase และ glycoprotein (G protein) (German *et al.*, 1992; Lawson *et al.*, 1996) ที่บริเวณปลาย 5' และ 3' ของสายอาร์เอ็นเอแต่ละสาย จะพบการเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์ 8 นิวคลีโอไทด์เป็นแบบเฉพาะตัว คือ 5' AUUGCUCU 3' และมีลักษณะเป็นคู่สมกัน จัดเป็นส่วนที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ของไวรัสใน Genus *Tospovirus* ที่มีความเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สายอาร์เอ็นเอของไวรัส (Kato *et al.*, 2000)

L-RNA มีรหัสจีโนมเป็นแบบ complementary strand มี 1 ORF (open reading frame) ทำหน้าที่ในการกำหนดการสังเคราะห์โปรตีน L ซึ่งเป็น viral RNA-dependent RNA polymerase (de Haan *et al.*, 1991; Prins and Goldbach, 1998; Okuda *et al.*, 2006) โปรตีนนี้เป็นส่วนประกอบที่สำคัญอยู่ในอนุภาคไวรัส พบในปริมาณน้อย มีลำดับกรดอะมิโนที่มีความจำเพาะสูง และสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ polymerase (de Haan *et al.*, 1991; Yeh and Chang, 1995; van Poelwijk *et al.*, 1996)

M-RNA มี 2 ORFs โดย ORF ที่ 1 อยู่บนอาร์เอ็นเอที่มีรหัสเป็น viral strand กำหนดการสังเคราะห์ nonstructural protein ที่เรียกว่า NSm ซึ่งเป็น movement protein ไม่เกี่ยวข้องกับการประกอบของอนุภาค ทำหน้าที่ในการเคลื่อนย้ายอาร์เอ็นเอของไวรัสที่ยังไม่มีเยื่อหุ้ม (envelope) จากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่ง (cell-to-cell) ส่วน ORF ที่ 2 อยู่บน complementary strand ควบคุมการสร้างโปรตีนที่ใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสร้างโปรตีน G1 และ G2 (glycoprotein) (Kormelink *et al.*, 1992; 1994; Pang *et al.*, 1993; Yeh and Chang, 1995) จากรายงานของ Kormelink *et al.* (1994) ทำการทดลองโคลนชิ้นส่วนที่ควบคุมการสร้าง NSm protein เข้ากับพลาสมิด pET-11 และย้ายเข้าสู่เซลล์ *E. coli* เพื่อสังเคราะห์ NSm protein จากนั้นสกัดเอาโปรตีนบริสุทธิ์และนำไปผลิต polyclonal antibody เพื่อให้แบคทีเรียนำไปใช้ใน Western immunoblot สำหรับวิเคราะห์การเข้าทำลายของ TSWV ในใบยาสูบ *N. rustica* โดยพบว่า NSm protein ในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ ช่วงแรกของการแสดงอาการของโรคแบบแพร่กระจายทั้งต้น (systemic) และพบ NSm protein อยู่ร่วมกันกับ N protein ใน cytoplasm แต่เมื่อสกัดไวรัสให้บริสุทธิ์จากใบพืชมักจะพบว่า NSm protein ได้สูญเสียไป และเมื่อใช้เทคนิค Immunogold labeling กับส่วนของเนื้อเยื่อยาสูบที่เป็นโรคจะพบ NSm protein อยู่รวมกลุ่มกับ N protein ใน cytoplasm และ plasmodesmata แสดงว่า NSm protein เป็น viral movement protein ของ TSWV

S-RNA มี 2 ORFs โดย ORF ที่ 1 อยู่บนอาร์เอ็นเอที่มีรหัสเป็น complementary strand กำหนดการสังเคราะห์ โปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิก (โปรตีน N) (Kato *et al.*, 2000) ทำหน้าที่เป็น โครงสร้างห่อหุ้มสารพันธุกรรมของไวรัส โปรตีน N สามารถส่งเสริมให้เริ่มกระบวนการลอกรหัส เพื่อเพิ่มปริมาณอาร์เอ็นเอของไวรัส โดยรวมตัวเป็น dimer และจับกับอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว เพื่อ ทำงานร่วมกับ ribonucleoprotein นอกจากนี้อาจเป็นตัวช่วยในการเพิ่มปริมาณอาร์เอ็นเอของไวรัสได้ เช่นกันถ้าโครงสร้างโปรตีน N เปลี่ยนแปลงไป (Richmond *et al.*, 1998; Whitfield *et al.*, 2005) ส่วนปลายด้าน 5' ของสายอาร์เอ็นเอของไวรัสเป็น viral strand กำหนดการสังเคราะห์โปรตีน NSs (Knierim *et al.*, 2006) มีบทบาทในการยับยั้งกระบวนการ RNA silencing ที่เกิดขึ้นในขณะที่เชื้อ ไวรัสเข้าทำลายพืช (Takeda *et al.*, 2002) ยีน NSs หรือโปรตีน NSs ของเชื้อทอสปอไวรัส อาจ เกี่ยวกับความรุนแรงของอาการ โรคทั้งในพืชและสัตว์ (Okuda *et al.*, 2003) นอกจากนี้อาจมี บทบาทเกี่ยวกับการจำลองอาร์เอ็นเอทั้งในพืช และเพลี้ยไฟพาหะ เนื่องจาก S RNA จะถูกจำลองทั้ง สายก่อนที่จะมีการลอกรหัสส่วนของยีน NSs (Ullman *et al.*, 1993a) ในกรณีของ M RNA และ S RNA ซึ่งอาร์เอ็นเอแต่ละสายมีอยู่ 2 ORF นั้น เมื่อลอกรหัสจะได้ mRNA สายยาว มีส่วนของ hairpin เป็น AU-rich ในส่วน intergenic region ทำหน้าที่เป็นสัญญาณหยุดการถอดรหัสพันธุกรรม (transcription terminator signal) (de Haan *et al.*, 1990; Whitfield *et al.*, 2005)

1.3 การถ่ายทอดเชื้อ

เชื้อ MYSV สามารถถ่ายทอดได้โดยวิธีกล (mechanical inoculation) และแมลงพาหะ แต่ไม่สามารถถ่ายทอดผ่านเมล็ด (seed transmission) ที่ได้จากต้นที่เป็นโรค หรือผ่านทางดิน (Kato *et al.*, 1999) ในสภาพธรรมชาติเชื้อ MYSV มีเพลี้ยไฟ (*Thrips plami*) เป็นพาหะในการถ่ายทอด โรค โดยมีความสัมพันธ์กันแบบคงทน (persistent) โดยเชื้อไวรัสจะเข้าสู่ภายในตัวแมลงหมูนเวียน และเพิ่มปริมาณภายในตัวแมลง (circulative propagative) ก่อนจะถ่ายทอดเชื้อต่อไป โดยพบว่า ส่วนของไกลโคโปรตีน G1 และ G2 ของเชื้อไวรัสมีความจำเพาะกับเซลล์เยื่อทางเดินอาหาร ของเพลี้ยไฟ ทำให้เชื้อไวรัสแต่ละชนิดมีความจำเพาะกับเพลี้ยไฟแตกต่างกัน (Persley *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังพบว่าเพลี้ยไฟที่ได้รับเชื้อไวรัสตั้งแต่ระยะตัวอ่อนจะสามารถถ่ายทอดโรคได้ตลอด อายุขัย และเพลี้ยไฟต้องได้รับเชื้อในระยะตัวอ่อนเท่านั้นจึงจะสามารถถ่ายทอดโรคได้ (Ullman *et al.*, 1993a, 1993b; Van de Wetering *et al.*, 1996)

2. เกณฑ์การจำแนกและระบุชนิดของเชื้อทอสปัวไวรัส

ในการระบุชนิดของเชื้อทอสปัวไวรัสจะใช้ความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโน และความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาของโปรตีน N เป็นเกณฑ์ ในรายงานการประชุมของ ICTV ในปี 2005 ระบุว่าเชื้อทอสปัวไวรัสชนิดเดียวกันจะต้องมีความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน N มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ และทอสปัวไวรัสต่างชนิดกันจะต้องมีความคล้ายคลึงกันน้อยกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ (Fauquet *et al.*, 2005) ด้วยเกณฑ์ดังกล่าวสามารถจำแนกเชื้อทอสปัวไวรัสได้สอดคล้องกับสมบัติทางซีรัมวิทยา ซึ่งจำแนกเป็นซีโรกรุ๊ป I ถึง IV ต่อมาเป็นผู้เสนอให้จัดแบ่งเชื้อทอสปัวไวรัสออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ ตามความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันทางซีรัมวิทยา คือ ซีโรกรุ๊ป *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) และ *Iris yellow spot virus* (IYSV) ส่วนเชื้อที่ไม่มีความสัมพันธ์กับเชื้ออื่น ได้แก่ *Impatiens necrotic spot virus* (INSV), *Peanut yellow spot virus* (PYSV), *Peanut chlorotic fan-spot virus* (PCFV) และ *Melon yellow spot virus* (MYSV) จะยังไม่มีการจัดซีโรกรุ๊ป (Knierim *et al.*, 2006, Chen *et al.*, 2010)

Akram *et al.* (2004) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของโปรตีน Movement (NSm) ของเชื้อ *Groundnut bud necrosis virus* (GBNV) 5 ไอโซเลท ที่พบในประเทศอินเดีย พบว่าเชื้อ GBNV ทั้ง 5 ไอโซเลท มีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 98-100 เปอร์เซ็นต์ และ phylogenetic tree ที่สร้างจากลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NSm แยกกลุ่มเชื้อ GBNV ทั้ง 5 ไอโซเลทออกจากเชื้อทอสปัวไวรัสชนิดอื่น การวิเคราะห์ด้วยกรดอะมิโนของโปรตีน N ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน

Zheng *et al.* (2008) ศึกษาเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดอาการ chlorotic ringspot บนใบของกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* ที่พบในประเทศไต้หวัน โดยตรวจสอบด้วยเทคนิคทางซีรัมวิทยาพบว่าทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมของเชื้อ WSMoV เล็กน้อย แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมของเชื้อ TSWV, INSV และ *Groundnut ringspot virus* (GRSV) เมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน L RNA พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อ PBNV, WSMoV, TSWV และ INSV ที่ระดับ 96.5, 97.7, 67.3 และ 67.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ phylogenetic relationships ของกรดอะมิโนของโปรตีน N พบว่าเชื้อที่ศึกษาจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อ CaCV ที่พบในประเทศออสเตรเลียและไทย จึงสรุปว่าเชื้อที่ศึกษานี้เป็นไอโซเลทหนึ่งของเชื้อ CaCV ให้ชื่อว่า CaCV ไอโซเลท Ph

Bag *et al.* (2010) วิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) พบว่าสามารถแยกเชื้อทอสปัวไวรัสออกเป็น 2 กลุ่ม คือ Eurasian และ

American โดยพบว่าในกลุ่มของ Eurasian มีการจับเป็นกลุ่มย่อยของเชื้อ CaCV, GBV และ WSMoV ส่วนเชื้อ MYSV, IYSV และ Tomato zonate spot virus (TZSV) แยกออกจากกัน

Seepiban *et al.* (2011) ศึกษาเชื้อทอสโปไวรัสที่ทำให้เกิดอาการ necrotic spots, necrotic ringspots และ stem necrosis ในมะเขือเทศที่พบในจังหวัดนครปฐม โดยตรวจสอบด้วยเทคนิคทางชีววิทยาพบว่าสามารถทำปฏิกิริยากับโพลีโคลนอลแอนติบอดี MYSV6 และ โมโนโคลนอลแอนติบอดี 2B2 (ซึ่งทำปฏิกิริยากับเชื้อ WSMoV, CaCV และ MYSV) รวมถึงทำปฏิกิริยากับโพลีโคลนอลแอนติบอดี A3 (ซึ่งทำปฏิกิริยากับเชื้อ WSMoV และ CaCV) แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2D6 และ L4E8 (ซึ่งทำปฏิกิริยากับเชื้อ WSMoV และ CaCV) และไม่เกิดปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5E7 (ซึ่งจำเพาะต่อเชื้อ MYSV) จากนั้นทำการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน N พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อทอสโปไวรัสชนิดอื่น ๆ น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จึงจัดเป็นเชื้อทอสโปไวรัสชนิดใหม่ให้ชื่อว่า Tomato necrotic ringspot virus (TNRV) นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน N และ NSs และนำมาสร้าง Phylogenetic tree แบ่งเชื้อทอสโปไวรัสออกเป็น 4 clusters โดย TNRV จัดอยู่ใน cluster ที่เป็นกลุ่มของเชื้อในแถบ Asian (CaCV, GBV, WSMoV, Calla lily chlorotic spot virus (CCSV), Watermelon bud necrosis virus (WBNV), TZSV และ MYSV) นอกจากนี้ Phylogenetic tree ของโปรตีน GnGc และ NSm ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน

3. การตรวจวินิจฉัยโรคพืชที่เกิดจากเชื้อทอสโปไวรัส

การใช้แอนติซีรั่มต่อไกลโคโปรตีน G1 และ G2 ของ TSWV ในการตรวจสอบเชื้อทอสโปไวรัสในซีโรกรุป II และ III พบว่าสามารถทำปฏิกิริยากับเชื้อทอสโปไวรัสต่างชนิดและต่างซีโรกรุปกันได้ ทั้งนี้เนื่องจากลำดับกรดอะมิโนของไกลโคโปรตีน G1 และ G2 ของเชื้อทอสโปไวรัสแต่ละชนิดมีความคล้ายคลึงกันมาก โดยไกลโคโปรตีน G1 จะมีความคล้ายคลึงกันมากกว่าโปรตีน G2 (Feldhoff *et al.*, 1997) ส่วนแอนติซีรั่มต่อโปรตีน N นั้นมักเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อทอสโปไวรัสต่างชนิดกันในซีโรกรุปเดียวกัน (Moyer, 1999; Chu *et al.*, 2001; Jones, 2005)

Hassani-Mehraban *et al.* (2005) ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน N ของเชื้อ Tomato yellow ring virus (TYRV) เมื่อนำมาใช้ตรวจสอบพบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ TSWV, Tomato chlorotic spot virus (TCSV) และ GRSV ซึ่งจัดอยู่ในซีโรกรุป TSWV (Moyer, 1999) แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับเชื้อ INSV, IYSV และ WSMoV

Chen *et al.* (2010) ศึกษาพบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน N ของเชื้อ WSMoV เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ MYSV ไอโซเลท TW, CaCV, PBNV, WBNV และ CCSV โมนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน N ของเชื้อ WSMoV เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ CaCV, PBNV และ WBNV นอกจากนี้ยังพบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน N ของเชื้อ MYSV ไอโซเลท TW ที่ผลิตได้นั้น เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ WSMoV, CaCV, PBNV, WBNV และ CCSV แต่โมนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน N ของเชื้อ MYSV ไอโซเลท TW สามารถทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับเชื้อ MYSV ไอโซเลท TW, MYSV ไอโซเลทจากประเทศไทยและญี่ปุ่น

Jain *et al.* (2005) พบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน N ของเชื้อ GBNV ที่แยกได้จากถั่ว (cowpea) สามารถตรวจสอบเชื้อ GBNV และ WBNV ที่เข้าทำลายพืชในวงศ์ *Cucurbitaceous*, *Leguminous* และ *Solanaceous* ได้อย่างจำเพาะ

อรประไพ และคณะ (2549) ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีและโมนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน N ของเชื้อ Thailand tomato tospovirus และโมนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน N ของเชื้อ WSMoV โคลน 2D6 ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับเชื้อ Thailand tomato tospovirus, CaCV และ WSMoV ได้ แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อ MYSV ส่วนโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน N ของเชื้อ MYSV และโมนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน N ของเชื้อ WSMoV โคลน 2B2 สามารถทำปฏิกิริยากับเชื้อ MYSV, Thailand tomato tospovirus, CaCV และ WSMoV ได้

สุภาวิณี (2550) ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี (PAb) ต่อโปรตีน N ของเชื้อทอสปอไวรัส 3 ชนิด พบว่า PAb-MYSV-M7 ทำปฏิกิริยากับเชื้อ MYSV, CaCV และ WSMoV ส่วน PAb-CaCV-KS16 และ PAb-WSMoV-P29 ทำปฏิกิริยากับเชื้อ CaCV และ WSMoV ซึ่งเป็นเชื้อที่จัดอยู่ในซีโรกรุป WSMoV โดยไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ MYSV และ PAb ทั้ง 3 ชนิดไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อไวรัสในจีนัสอื่นๆ จำนวน 7 ชนิด คือ *Potato virus Y* (PVY), *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), *Chilli veinal mottle virus* (ChiVMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) และ *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV)

4. การใช้แอนติซีรั่มต่อโปรตีน NSs ในการตรวจวินิจฉัยทอสโฟไวรัส

Heinze *et al.* (1995) เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NSs ของเชื้อทอสโฟไวรัสหลายชนิดจากซีโรกรุป I ถึง IV พบว่ากรดอะมิโน 24 เรซิดิวส์ ด้านปลายหมู่คาร์บอกซิลของสายเปปไทด์ (peptide) (ตำแหน่งที่ 398-421 ของเชื้อ TSWV) มีความคล้ายคลึงกัน 56-68 เปอร์เซ็นต์ และ Heinze *et al.* (2000) ผลิตแอนติบอดีต่อสายเปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 24 เรซิดิวส์ที่มีความอนุรักษ์ทางด้านปลายหมู่คาร์บอกซิลของโปรตีน NSs นี้ พบว่าแอนติบอดี A338 สามารถตรวจเชื้อ TSWV, GRSV, TCSV และ INSV ซึ่งจัดอยู่ในซีโรกรุป I, II และ III ตามลำดับ ยกเว้นเชื้อ WSMoV ที่จัดอยู่ในซีโรกรุป IV เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค antigen coated plate (ACP-ELISA) แสดงว่าด้านปลายหมู่คาร์บอกซิลมีส่วนของลำดับเปปไทด์ที่มีความเหมือนกันในซีโรกรุป I, II และ III จึงสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ดีกับทุกไอโซเลต ยกเว้นซีโรกรุป IV แสดงว่าการมี epitope บนโปรตีนของเชื้อทอสโฟไวรัสชนิดต่างๆ ในซีโรกรุป I, II และ III ที่คล้ายคลึงกัน (common epitope) ทำให้เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแอนติบอดีชนิดเดียวกันได้ (Adam *et al.*, 1995) นอกจากนี้ยังพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากโปรตีน NSs ของ WSMoV สามารถใช้ตรวจสอบเชื้อส่วนใหญ่ใน serogroup IV ได้ (Chen *et al.*, 2006)

Chen *et al.* (2010) ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ common epitope ของโปรตีน NSs ของเชื้อทอสโฟไวรัสซีโรกรุป WSMoV พบว่าสามารถทำปฏิกิริยากับเชื้อ WSMoV, CaCV, CCSV, PBNV และ WBNV รวมถึงเชื้อ MYSV ไอโซเลต TW ด้วย เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี indirect ELISA และ western blotting แสดงให้เห็นว่าเชื้อ MYSV-TW มี common epitope ของโปรตีน NSs เดียวกันกับเชื้อทอสโฟไวรัสซีโรกรุป WSMoV

สุรศักดิ์ (2550) ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน NSs ของเชื้อ CaCV ไอโซเลต PPT ที่พบเข้าทำลายถั่วลิสงในจังหวัดนครราชสีมา ที่ทำปฏิกิริยาได้อย่างจำเพาะกับเชื้อ CaCV ไอโซเลต PPT และ PKK โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ WSMoV และ MYSV

อุปกรณ์และวิธีการ

1. แหล่งของเชื้อ Melon yellow spot virus (MYSV)

1.1 ตัวอย่างพืชที่ได้จากแปลงปลูก

เก็บตัวอย่างใบแตงกวา แตงร้าน แตงโม โทงเทง และพริก ที่แสดงอาการจุดประหลือง ซึ่งคาดว่าติดเชื้อ MYSV จากแปลงปลูกของเกษตรกรในจังหวัดนครปฐม นครราชสีมา และเพชรบุรี ใส่ใบพืชในถุงพลาสติกและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำตัวอย่างมาตรวจวินิจฉัยโรคด้วยเทคนิค DAC-ELISA

1.2 ตัวอย่างพืชที่ได้รับความอนุเคราะห์

1.2.1 ตัวอย่างใบเมลอนที่แสดงอาการใบจุดประหลืองซึ่งคาดว่าติดเชื้อ MYSV จากโรงเรียนปลูกพืชโดยได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.โสภณ วงศ์แก้ว สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ใส่ใบพืชในถุงพลาสติกและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำตัวอย่างมาตรวจวินิจฉัยโรคด้วยเทคนิค DAC-ELISA

1.2.2 ตัวอย่างใบแตงร้านและใบเมลอนที่แสดงอาการใบจุดประหลือง ซึ่งคาดว่าติดเชื้อ MYSV จากบริษัท โกลส (ประเทศไทย) จำกัด ตำบลวังเย็น อำเภอเมือง จังหวัดกาญจนบุรี ใส่ใบพืชในถุงพลาสติกและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำตัวอย่างมาตรวจวินิจฉัยโรคด้วยเทคนิค DAC-ELISA

1.3 แอนติบอดีที่ใช้ในการตรวจสอบ

1.3.1 PAb-Tospo A1-N (ออร์ประไฟ และคณะ, 2549) ผลิตจากการใช้โปรตีน N ของเชื้อ Thailand tomato tospovirus เป็นแอนติเจน โดยทำปฏิกิริยากับเชื้อ WSMoV, CaCV และ TNRV ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. อรประไพ คชนันท์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

1.3.2 PAb-MYSV6-N (สุภาวิณี, 2550) ผลิตจากการใช้โปรตีน N ของเชื้อ MYSV เป็นแอนติเจน ทำปฏิกิริยากับเชื้อ MYSV, WSMoV, CaCV และ TNRV ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. รัชณี ธงประยูร ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน

1.3.3 MAb-5E7-N (อรประไพ และคณะ, 2549) ผลิตจากการใช้โปรตีน N ของเชื้อ MYSV เป็นแอนติเจน ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับเชื้อ MYSV ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. อรประไพ คชนันท์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

1.3.4 PAb-CaCV-NSs (สุรศักดิ์, 2550) ผลิตจากการใช้โปรตีน NSs ของเชื้อ CaCV เป็นแอนติเจน ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับเชื้อ CaCV

1.3.5 PAb-TNRV-N (คณินิจ, 2553) ผลิตจากการใช้โปรตีน N ของเชื้อ TNRV เป็นแอนติเจน ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับเชื้อ TNRV

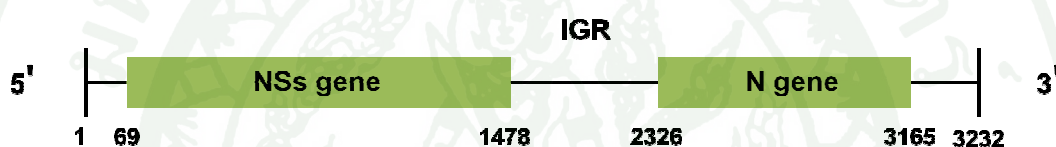
2. การสังเคราะห์ยีน N และ NSs

2.1 การสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากใบพืช

สกัดอาร์เอ็นเอรวมจากใบเมลอน ไอโซเลท SUT ที่ติดเชื้อด้วยวิธีที่ปรับปรุงจาก Chang *et al.* (1993) โดยชั่งตัวอย่างใบเมลอน 0.1 กรัม บดด้วยไนโตรเจนเหลวให้เป็นผงละเอียด แล้วย้ายใส่ในหลอด micro- centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่เติม CTAB buffer (2% CTAB, 2%PVP, 100 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 25 mM EDTA; อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 5-10 นาที ก่อนใช้) และ 2-mercaptoethanol ปริมาตรรวม 630 ไมโครลิตร บ่มใน waterbath อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เติม Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่าของสารละลาย ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่แล้วเติม 10 M LiCl ปริมาตร 1/4 เท่าของส่วนใส ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับลอดไปมาเบาๆ นำไปบ่มที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติม SSTE (1M NaCl, 0.5% SDS, 1mM tris-HCl, pH 8.0; อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 5 นาที ก่อนใช้) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร เติม Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่าของสารละลาย ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที ดูด

ส่วนใส 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ จากนั้นเติม absolute ethanol ปริมาตร เท่ากัน บ่มที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทสารละลายทิ้ง แล้วเติม 70% ethanol ที่เย็น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที เท ethanol ทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนแห้ง แล้วละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่เติม diethyl pyrocarbonate (DEPC) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ตรวจอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการทำ gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำ gel มาย้อมด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และตรวจดูแถบอาร์เอ็นเอ

2.2 การออกแบบไพรเมอร์ (primers)



ภาพที่ 1 แผนภาพจำลองโครงสร้างสายพันธุกรรม S RNA ของเชื้อ Melon yellow spot virus ไอโซเลต Tospo-melo (MYSV-Tospo-melo) ขนาด 3232 นิวคลีโอไทด์

NSs gene = non-structural gene

N gene = nucleocapsid gene

IGR = intergenic region

ตัวเลขแสดงตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์

ที่มา: Kato *et al.*, 2000

ออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อ N gene จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ MYSV ไอโซเลต Tospo-melo (ภาพที่ 1) ได้แก่ MYSV-CP-R (reverse) ที่เพิ่มตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction site) *Pst*I บริเวณปลาย 5' ของสายไพรเมอร์ 5'-CTG CAG TTA AAC TTC AAT GGA CTT AG-3' และ MYSV-CP-F (forward) ที่เพิ่มตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI บริเวณปลาย 5' ของสายไพรเมอร์ 5'-GGA TCC ATG TCT ACC GTT GCT AAG-3' ซึ่งจะให้ผลผลิตดีเอ็นเอที่มีขนาด 852 นิวคลีโอไทด์

ออกแบบไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ NSs gene ของเชื้อ MYSV โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>) ได้แก่ Reverse primer คือ MYSV-NSs1-R 5'-TCT CCT TCT CCT CTT CCA TCT-3' และ Forward primer คือ MYSV-NSs3-F ที่เพิ่มตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI บริเวณปลาย 5' ของสายไพรเมอร์ 5'-GGA TCC ATG GCT AAC GCA TAC-3' ซึ่งจะให้ผลผลิตดีเอ็นเอที่มีขนาด 1,452 นิวคลีโอไทด์

2.3 ปฏิกริยา Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

สังเคราะห์ cDNA ด้วยเทคนิค two-step RT-PCR ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยเติม DEPC-dH₂O อาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างใบพืช และสายไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน N และ NSs ของเชื้อ MYSV ความเข้มข้น 2 ไมโครโมล ลงในหลอด PCR จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วนำมาวางบนน้ำแข็งทันที นาน 5 นาที นำมาเติมสารให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1x RT buffer และ 1mM dNTPs บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเติม 200 Unit Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) reverse transcriptase (Bioneer) แล้วนำมาบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

นำ cDNA ที่ได้มาสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ใช้ dH₂O, cDNA 3 ไมโครลิตร เติมสารให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1x PCR buffer, 0.5 mM MgCl₂, 1 mM dNTPs, ไพรเมอร์ ชนิดละ 0.5 ไมโครโมล และ 0.05 Unit Taq polymerase จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ pre-heating ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที annealing ที่ 52 องศาเซลเซียส สำหรับยีน N และ 58 องศาเซลเซียส สำหรับยีน NSs นาน 45 วินาที extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที สำหรับยีน N และ 90 วินาที สำหรับยีน NSs จำนวน 35 รอบ เมื่อครบ 35 รอบแล้วให้บ่มต่อที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา extension ได้อย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำมาตรวจสอบผลผลิตด้วย agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 40 นาที แล้วย้อมด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ

3. การโคลนยีน N และ NSs ของเชื้อ MYSV

นำผลผลิตดีเอ็นเอจากการทำปฏิกิริยา RT-PCR จากตัวอย่างใบเมลอนไอโซเลท SUT มาแยกขนาดดีเอ็นเอ ด้วย 1% agarose gel electrophoresis แล้วตัดเอาเฉพาะแถบ ดีเอ็นเอที่เป็นส่วน

ของยีน N และ NSs แยกออกจากเจลโดยใช้ Wizard SV Gel and Clean-Up System (Promega) ตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 1% agarose gel electrophoresis แล้วเชื่อมต่อดีเอ็นเอของยีน N และ NSs ที่ได้เข้ากับพลาสมิด pGEM-T Easy (Promega) ย้ายดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียโดยวิธี heat-shock และคัดเลือกพลาสมิดสายผสมที่มียีน N และ NSs ด้วยวิธีการ blue-white colony selection (Sambrook *et al.*, 2001) แล้วตรวจสอบโคลนที่ได้ด้วยเทคนิค Bio-PCR โดยนำเซลล์แบคทีเรียที่ให้โคโลนีสีขาวมาผสมน้ำปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน N และ NSs

4. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน N และ NSs

นำพลาสมิดสายผสมที่คัดเลือกได้ส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน N และ NSs ด้วยเครื่อง Automated DNA sequencer จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม DNA Star แล้วเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับเชื้อทอสปอไวรัสที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank (ตารางที่ 1) และสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม CLC Main Workbench 5 (CLC bio)

5. การเชื่อมต่อยีน NSs เข้ากับพลาสมิดพาหะ pQE-80L ที่ใช้สังเคราะห์โปรตีน

สกัดพลาสมิดจากโคลนแบคทีเรีย *E. coli* DH5 α ที่มีชิ้นส่วนของยีนสอดแทรกอยู่แยกชิ้นส่วนยีน NSs จาก pGEM-T easy vector โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sph*I ตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนยีนด้วย 1% agarose gel electrophoresis แยกดีเอ็นเอออกจากเจลเพื่อนำไปเชื่อมต่อเข้าสู่พลาสมิดพาหะสำหรับสังเคราะห์โปรตีน pQE-80L expression vector ในตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sph*I การเชื่อมต่อทำโดยผสมชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน NSs 150 ไมโครลิตร พลาสมิด pQE-80L 50 นาโนกรัม 1x T4 DNA ligase buffer และ T4 DNA ligase 3 Unit ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ *E. coli* DH5 α ด้วยวิธี heat shock และเติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำส่วนผสม 100 ไมโครลิตร เกลี่ยบนจานอาหารแข็ง LB ที่เติม ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน คัดเลือกพลาสมิดสายผสมโดยเฉพาะเลี้ยงโคโลนีในอาหารเหลว LB ที่

เติม ampicillin นานข้ามคืน จากนั้นสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Boiling และละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น
 นำเชื้อปริมาตร 30 ไมโครลิตร คัดเลือกโคลน และตรวจสอบทิศทาง การเชื่อมต่อของยีน NSs
 กับพลาสมิด pQE-80L ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้สายไพรเมอร์จำเพาะต่อพลาสมิดพาหะ pQE-80L
 คือ 5'pQE-forward 5'-GTG AGC GGA TAA CAA TTT CAC AC-3' และ 3'pQE-Reverse 5'-CAA
 CAG GAG TCC AAG CTC AG-3' แล้วนำโคลนที่ได้ไปสังเคราะห์โปรตีน NSs ในสภาพปลอด
 ทดลอง

6. การสังเคราะห์โปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs และวิธีแยกสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์

คัดเลือกโคลนที่มีพลาสมิดสายผสมของยีน NSs มาเพาะเลี้ยงในอาหาร 2xYT ที่เติมยา
 ปฏิชีวนะ ampicillin อัตรา 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา
 เซลเซียส ในสภาวะเขย่า นานข้ามคืน จากนั้นเติมลงในอาหาร 2xYT ที่เติมยาปฏิชีวนะ ampicillin
 เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในอัตราส่วน 1:30 โดยปริมาตร บ่มที่
 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่า นาน 2 ชั่วโมง และเติม IPTG ให้ความเข้มข้นสุดท้าย
 เป็น 1 mM เพื่อชักนำให้สังเคราะห์โปรตีน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่า นาน 8
 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดปั่นตกตะกอนเซลล์ด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 40 นาที ที่อุณหภูมิ 4
 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้งและเก็บตะกอนเซลล์

เตรียม clear lysate จากตะกอนเซลล์ด้วยวิธี denature condition โดยนำตะกอนเซลล์มาเติม
 lysis buffer (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-base, 8 M urea pH 8.0) ทำให้เซลล์แตกโดยวิธี
 freeze-thaw จากนั้นปั่นตกตะกอนเซลล์ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 40 นาที ที่อุณหภูมิ 4
 องศาเซลเซียส ทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยวิธี Affinity chromatography โดยนำส่วนใสมาเติม 50%
 Ni-NTA agarose (QIAGEN) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าที่ความเร็วต่ำนาน 1
 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง นำ Ni-NTA agarose ที่จับกับ recombinant protein มาใส่ลงใน column โดย
 ปิดปลายไว้ก่อน จากนั้นนำฟลิปคอปเปอร์ปล่อยให้ส่วนใสไหลผ่าน column ออกมา หลังจากนั้นล้าง
 column ด้วย wash buffer (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-base, 8 M urea pH 6.3) จำนวน 2 ครั้ง
 ๆ ละ 8 มิลลิลิตร จะล้างโปรตีนออกจาก column ด้วย Elution buffer (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM
 Tris-base, 8 M urea pH 4.5) ปริมาตร 8 มิลลิลิตร โดยเติม 10 mM Tris-base ปริมาตร 20
 ไมโครลิตร ในหลอดที่จะเก็บส่วนใสที่ไหลผ่าน column และเก็บส่วนใสที่ไหลผ่าน column
 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE และหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford's
 method (Bradford, 1976)

7. การผลิต polyclonal antibody ต่อโปรตีน 6xHis-NSs

ผลิต polyclonal antibody ต่อโปรตีน 6xHis-NSs โดยใช้กระต่าย New Zealand white อายุประมาณ 2 เดือน ก่อนการกระตุ้นกระต่ายให้สร้างภูมิคุ้มกัน เก็บ normal serum โดยเข็ดหลังใบหูด้วย 70% ethanol และเจาะเลือดปริมาตร 30 มิลลิลิตร เพื่อใช้เปรียบเทียบปฏิกิริยาในขั้นตอนต่อไป เตรียมแอนติเจนเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรกโดยใช้โปรตีน 6xHis-NSs บริสุทธิ์ปริมาณ 500 ไมโครกรัม (ที่ผ่านการ dialysis ด้วย 1X PBS ที่ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน) ผสมกับ complete Freund's adjuvant (CFA) ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ฉีดกระตุ้นด้วยวิธี subcutaneous injection (SC) บริเวณต้นคอด้านหลัง 3 จุด เว้นระยะหนึ่งสัปดาห์จึงกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการเตรียมแอนติเจนปริมาณเท่าเดิมใน incomplete Freund's adjuvant (IFA) จากนั้น 2 สัปดาห์ เจาะเลือดใส่ปิเปตเตอร์ปลอดเชื้อเพื่อเก็บแอนติบอดีปริมาตร 30 มิลลิลิตร ทุกสัปดาห์ นาน 5 สัปดาห์ แต่จะแยกแอนติบอดีจากเม็ดเลือดโดยวางเลือดในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน และปั่นตกตะกอนที่ความเร็วประมาณ 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แยกเก็บแอนติซีรัมซึ่งเป็นส่วนใสด้านบนในขวดซีรัมโดยเติม NaN_3 ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2% (v/v) เพื่อป้องกันเชื้อแบคทีเรีย เก็บแอนติบอดีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8. การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีในการวินิจฉัยเชื้อทอสโปไวรัส

8.1 การตรวจสอบค่าไตเตอร์

ตรวจสอบค่าความเจือจางสูงสุด (dilution end point) และค่าไตเตอร์ (titer) ของแอนติบอดีด้วยเทคนิค DAC-ELISA โดยเตรียมโปรตีน 6xHis-NSs บริสุทธิ์ปริมาณ 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นแอนติเจนสำหรับ coat ในหลุม ELISA plate ทำการเจือจางแอนติบอดีต่อโปรตีน NSs ของเชื้อ MYSV-SUT (PAb-MYSV-NSs) แบบ 2-fold dilution เริ่มจาก 1:100 ถึง 1:204800 เพื่อใช้เป็น primary antibody และ Alkaline phosphatase conjugated-Goat anti rabbit IgG เป็น secondary antibody ด้วยเทคนิค DAC-ELISA เปรียบเทียบกับ normal serum ที่เจือจาง 1:100 ถึง 1:204800 เท่า

8.2 การทดสอบความจำเพาะต่อเชื้อ MYSV

8.2.1 ตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ผลิตได้กับเชื้อทอสโปไวรัส

ทดสอบประสิทธิภาพ และความจำเพาะ ของแอนติบอดีในการทำปฏิกิริยากับ โปรตีน 6xHis-NSs บริสุทธิ์ของเชื้อ MYSV-SUT บริสุทธิ์ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และในน้ำคั้นพืชเป็นโรคกับพืชปกติ ด้วยเทคนิค DAC-ELISA และ Dot immunobinding assay (DIBA) เปรียบเทียบกับการใช้ PAb-MYSV6-N โดยพืชเป็นโรคที่ใช้ ได้แก่ ใบเมลอนและใบ แตงร้านติดเชื้อ MYSV ใบโทงเทงติดเชื้อ WSMoV ใบโทงเทงติดเชื้อ CaCV และใบยาสูบติดเชื้อ TNRV

ก. ตรวจสอบด้วยเทคนิค DAC-ELISA

ใช้ PAb-MYSV-NSs ครั้งที่ 4 ที่เจือจาง 1:500 เท่า และ PAb-MYSV6-N ที่เจือจาง 1:1000 เท่า เพื่อใช้เป็น primary antibody และ Alkaline phosphatase conjugated-Goat anti rabbit IgG ที่เจือจาง 1:10,000 เท่า เป็น secondary antibody

ข. ตรวจสอบด้วยเทคนิค Dot immunobinding assay (DIBA)

ใช้ PAb-MYSV-NSs ครั้งที่ 4 ที่เจือจาง 1:500 เท่า และ PAb-MYSV6-N ที่เจือจาง 1:1000 เท่า เพื่อใช้เป็น primary antibody และ Alkaline phosphatase conjugated-Goat anti rabbit IgG ที่เจือจาง 1:30,000 เท่า เป็น secondary antibody

ทำโดยตัดแผ่น nitrocellulose membrane ขนาดกว้าง 5×2 เซนติเมตร (1 ตัวอย่างใช้แผ่น nitrocellulose membrane ขนาด 1×1 เซนติเมตร) ตีตารางบนแผ่นกระดาษไขเพื่อให้ เกิดรอยบนแผ่น nitrocellulose membrane จากนั้นแช่แผ่น nitrocellulose membrane ใน 1X TBS นาน 5 นาที บดตัวอย่างใบพืชใน 1X PBS สกัดส่วนเนื้อเยื่อพืชต่อบัพเฟอร์เป็น 1:10 (w/v) จากนั้นนำ แผ่น nitrocellulose membrane ผึ่งให้หมาด แล้วหยดน้ำคั้นของตัวอย่างลงบนแผ่น membrane ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยหยดตัวอย่าง 1 ตัวอย่างต่อ 1 ช่อง (ระวังอย่าให้น้ำคั้นของตัวอย่าง กระจายข้ามไปช่องข้างเคียง) ผึ่งให้หมาด แล้วนำไปใส่ blocking solution (2% w/v skim milk ใน TBS-T buffer) เขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ระหว่างนี้เตรียม primary antibody ที่จับกับ แอนติเจนที่ต้องการตรวจ โดยเจือจางแอนติบอดีใน blocking solution ที่เติมน้ำคั้นจากใบพืชปกติ ซึ่งบดใน PBS ความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำคั้นใบพืชเป็น 1:50 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เมื่อครบเวลาการ blocking ล้างด้วย TBST buffer นาน 3-5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้น เติม primary antibody ไมโครลิตร แล้วเขย่านาน 30 นาที เมื่อครบเวลาล้างด้วย PBST buffer

จากนั้นเตรียม secondary antibody ซึ่งเป็น alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G (AP conjugated-GAR IgG) เจือจาง 1:30,000 (v/v) ใน blocking solution หรือใช้ AP conjugated-goat anti-mouse immunoglobulin G (AP conjugated-GAM IgG) เจือจาง 1:10,000 (v/v) เป็น secondary antibody ในกรณีที่ใช้ monoclonal antibody เป็น primary antibody เมื่อล้างด้วย PBST buffer แล้วเติม secondary antibody ที่เตรียมและเขย่านาน 30 นาที ครบเวลาล้างด้วย PBST buffer และเติมสารละลาย *p*-nitrophenyl phosphate ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเตรียมใน substrate buffer (10% Diethanolamine, pH 9.8) เก็บในที่มืดจนกว่าจะเห็นการเกิดปฏิกิริยา (โดยสังเกตการเกิดปฏิกิริยาไม่เกิน 30 นาที)

8.2.2 ตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ผลิตได้กับเชื้อทอสมะไวรัสและไวรัสชนิดอื่นที่เข้าทำลายพืชวงศ์แตง

ทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมในการทำปฏิกิริยากับโปรตีน 6xHis-NSs บริสุทธิ์ของเชื้อ MYSV-SUT บริสุทธิ์ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และในน้ำคั้นพืชเป็นโรคกับพืชปกติ ด้วยเทคนิค DAC-ELISA เปรียบเทียบกับ PAb-MYSV6-N, PAb-CaCV-NSs, PAb-TNRV-N และ PAb-Tospo A1-N โดยพืชเป็นโรคที่ใช้ ได้แก่ ใบเมลอนและใบแตงร้านติดเชื้อ MYSV ใบโงนเทงติดเชื้อ WSMoV ใบโงนเทงติดเชื้อ CaCV ใบยาสูบติดเชื้อ TNRV ใบยาสูบติดเชื้อ *Cucumber mosaic virus* (CMV) ใบฟักทองติดเชื้อ *Papaya ringspot virus* (PRSV)

9. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการ A 410 และห้องปฏิบัติการซีรัมวิทยาและตรวจวินิจฉัย ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

10. ระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง

เริ่มการทดลองเดือนมกราคม พ.ศ. 2551 สิ้นสุดการทดลอง เดือนมีนาคม พ.ศ. 2554

ตารางที่ 1 เชื้อทอสโปไวรัส ไอโซเลต พืชอาศัย สถานที่พบ ชื่อจีน และ accession number ของจีน Nucleocapsid (N) และ Non-Structural (NSs) ที่ใช้ในการวิเคราะห์ร่วมกับเชื้อ Melon yellow spot virus (MYSV) ที่ศึกษาครั้งนี้

เชื้อไวรัส	ไอโซเลต	พืชอาศัย	สถานที่พบ	Accession number		อ้างอิง
				จีน N	จีน NSs	
MYSV	SUT	เมลอน	ไทย	FR714507	FN994987	Wiboonchoti korn <i>et al.</i> , 2012
MYSV	Tospo-melo	เมลอน	ญี่ปุ่น	AB038343	AB038343	Kato <i>et al.</i> , 2000
MYSV	TW	แตงโม	ไต้หวัน	FJ386391	FJ386391	Chen <i>et al.</i> , 2008
MYSV	C95S	แตงกวา	ญี่ปุ่น	AB453911	AB457617	Takeuchi <i>et al.</i> , 2009
MYSV	B07T	มะระ	ญี่ปุ่น	AB453910	AB453909	Takeuchi <i>et al.</i> , 2009
MYSV	JTC	แตงกวา	ไทย	AY673635	-	Chiemsombat <i>et al.</i> , 2008
MYSV	Luffah 13	บวบ	ไทย	AM087020	-	Chiemsombat <i>et al.</i> , 2008
MYSV	M7	เมลอน	ไทย	AY574574	-	Chiemsombat <i>et al.</i> , 2008
MYSV	WS1	แตงโม	ไทย	FJ947154	-	Seepiban <i>et al.</i> , 2009
MYSV	W3-Kalasin	แตงโม	ไทย	AY673636	-	Chiemsombat <i>et al.</i> , 2008
MYSV	Ph122	โทงเทง	ไทย	AM113769	-	Chiemsombat <i>et al.</i> , 2008
MYSV	W6422	แตงโม	ไทย	AM113767	-	Chiemsombat <i>et al.</i> , 2008
MYSV	Kochi-Haruno	แตงกวา	ญี่ปุ่น	AB076250	-	

ตารางที่ 1 (ต่อ)

เชื้อไวรัส	ไอโซเลต	พืชอาศัย	สถานที่พบ	Accession number		อ้างอิง
				จีน N	จีน NSs	
WSMoV	Tospo-W	แดงโม	ไต้หวัน	NC_003843	NC_003843	Yeh et al., 1996
WSMoV	KB	แดงโม	ไทย	-	FR695063	
CaCV	AIT	มะเขือเทศ	ไทย	NC_008301	NC_008301	Knierim <i>et al.</i> , 2006
CaCV	KK	ถั่วลิสง	ไทย	FJ947157	FJ947157	Seepiban <i>et al.</i> , 2009
CaCV	PPT	ถั่วลิสง	ไทย	EF602029	EF602030	สุรศักดิ์ และคณะ, 2550
CaCV	PKK-2UD	ถั่วลิสง	ไทย	AM087456	EF488164	สุรศักดิ์ และคณะ, 2550
TNRV	TT1	มะเขือเทศ	ไทย	FJ489600	FJ489600	Seepiban <i>et al.</i> , 2011
TNRV	CR	มะเขือเทศ	ไทย	FN995637	FN677988	Chiemsombat <i>et al.</i> , 2010

ผลและวิจารณ์

1. การเก็บตัวอย่างและตรวจสอบเชื้อ Melon yellow spot virus ด้วยเทคนิค DAC-ELISA

1.1 ตัวอย่างพืชที่ได้จากแปลงปลูก

ตัวอย่างพืชที่เก็บจากแปลงปลูกในจังหวัดนครปฐม นครราชสีมา และเพชรบุรี มี 5 ชนิด คือ แตงกวา 175 ตัวอย่าง แตงร้าน 139 ตัวอย่าง แตงโม 1 ตัวอย่าง โทงเทง 1 ตัวอย่าง และพริก 5 ตัวอย่าง เมื่อตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค DAC-ELISA พบว่าแตงกวา 34 ตัวอย่าง แตงร้าน 21 ตัวอย่าง และพริก 3 ตัวอย่าง เกิดปฏิกิริยากับ PAb-Tospo A1-N (ซึ่งทำปฏิกิริยากับเชื้อ WSMoV, CaCV และ TNRV) และพบว่าแตงกวา 31 ตัวอย่าง และแตงร้าน 80 ตัวอย่าง เกิดปฏิกิริยากับ PAb-MYSV6-N (ซึ่งทำปฏิกิริยากับเชื้อ WSMoV, CaCV, MYSV และ TNRV) (ตารางที่ 2)

แสดงว่าแตงกวา 31 ตัวอย่างและแตงร้าน 21 ตัวอย่าง ถูกเชื้อ MYSV และเชื้อทอสโปไวรัสชนิดอื่น (WSMoV, CaCV หรือ TNRV) เข้าทำลายร่วมกัน ส่วนแตงกวา 3 ตัวอย่าง และพริก 3 ตัวอย่างถูกเชื้อทอสโปไวรัสชนิดอื่น (WSMoV, CaCV หรือ TNRV) เข้าทำลายเพียงอย่างเดียว และแตงร้าน 59 ตัวอย่างถูกเชื้อ MYSV เข้าทำลายเพียงอย่างเดียว และไม่พบการเข้าทำลายของเชื้อทอสโปไวรัสทั้ง 4 ชนิด ในตัวอย่างแตงโมและโทงเทง

ตารางที่ 2 ผลการตรวจสอบเชื้อ Melon yellow spot virus (MYSV) ในตัวอย่างแตงกวาและแตงร้าน (*Cucumis sativus*) แตงโม (*Citrullus lanatus*) โทงเทง (*Physalis angulata*) และพริก (*Capsicum annuum*) ที่เก็บจากแปลงปลูกโดยใช้แอนติซีรัม PAb-Tospo A1-N และ PAb-MYSV6-N วิเคราะห์ด้วยเทคนิค DAC-ELISA

ชนิดพืช	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจ	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกกับแอนติซีรัม	
		PAb-Tospo A1-N	PAb-MYSV6-N
<i>Cucumis sativus</i> (แตงกวา)	175	34	31
<i>C. sativus</i> (แตงร้าน)	139	21	80
<i>Citrullus lanatus</i> (แตงโม)	1	0	0
<i>Physalis angulata</i> (โทงเทง)	1	0	0
<i>Capsicum annuum</i> (พริก)	5	3	0

1.2 ตัวอย่างพืชที่ได้รับความอนุเคราะห์



ภาพที่ 2 อาการผิดปกติบนตัวอย่างใบเมลอนจากโรงเรือนในจังหวัดนครราชสีมา (ก) และแปลงปลูกของบริษัทโคลส (ประเทศไทย) จำกัด (ข) ที่ตรวจพบเชื้อ Melon yellow spot virus ด้วยเทคนิค DAC-ELISA โดยใช้แอนติบอดี PAb-MYSV6-N และ MAb-5E7-N

1.2.1 ตัวอย่างใบเมลอนจากโรงเรือนในจังหวัดนครราชสีมา (ภาพที่ 2ก) จำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่าเกิดปฏิกิริยากับ PAb-MYSV6-N (ซึ่งทำปฏิกิริยากับเชื้อ WSMoV, CaCV, MYSV และ TNRV) 13 ตัวอย่าง เกิดปฏิกิริยากับ MAb-5E7-N (ซึ่งจำเพาะกับเชื้อ MYSV) 13 ตัวอย่าง และไม่พบการเกิดปฏิกิริยากับ PAb-Tospo A1-N (ตารางที่ 3) แสดงว่าตัวอย่างใบเมลอนทั้ง 13 ตัวอย่างถูกเชื้อ MYSV เข้าทำลายเพียงอย่างเดียว เลือกตัวอย่างใบเมลอน 1 ตัวอย่าง นำมาสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป โดยให้ชื่อไอโซเลตว่า SUT (MYSV-SUT)

1.2.2 ตัวอย่างใบแตงร้าน 7 ตัวอย่าง และใบเมลอน 7 ตัวอย่าง (ภาพที่ 2ข) จากบริษัทโคลส (ประเทศไทย) จำกัด ตำบลวังเย็น อำเภอเมือง จังหวัดกาญจนบุรี พบว่าเมลอน 6 ตัวอย่างเกิดปฏิกิริยากับ PAb-Tospo A1-N และ เมลอน 7 ตัวอย่างเกิดปฏิกิริยากับ PAb-MYSV6-N และไม่พบการเกิดปฏิกิริยาของแอนติบอดีในแตงกวาทั้ง 7 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3) แสดงว่าเมลอน 6 ตัวอย่างถูกเชื้อ MYSV และเชื้อทอสปอไวรัสชนิดอื่น (WSMoV, CaCV หรือ TNRV) เข้าทำลายร่วมกัน และเมลอน 1 ตัวอย่างถูกเชื้อ MYSV เข้าทำลายเพียงอย่างเดียว และไม่พบการเข้าทำลายของเชื้อทอสปอไวรัสทั้ง 4 ชนิด ในแตงกวาทั้ง 7 ตัวอย่าง

ตารางที่ 3 ผลการตรวจสอบเชื้อ Melon yellow spot virus (MYSV) ในตัวอย่างเมลอน (*Cucumis melo*) และแตงร้าน (*Cucumis sativus*) ที่เก็บจากโรงเรือนในจังหวัดนครราชสีมาและแปลงปลูกของบริษัทโคส (ประเทศไทย) จำกัด โดยใช้แอนติบอดี PAb-Tospo A1-N, PAb-MYSV6-N และ MAb-5E7-N วิเคราะห์ด้วยเทคนิค DAC-ELISA

ชนิดพืช	จำนวนตัวอย่าง ที่ตรวจ	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกกับแอนติบอดี		
		PAb-Tospo A1-N	PAb-MYSV6-N	MAb-5E7-N
<i>Cucumis melo</i> (นครราชสีมา)	15	0	13	13
<i>Cucumis sativus</i> (กาญจนบุรี)	7	0	0	0
<i>Cucumis melo</i> (กาญจนบุรี)	7	6	7	0

2. การสังเคราะห์และการโคลนยีน N และ NSs

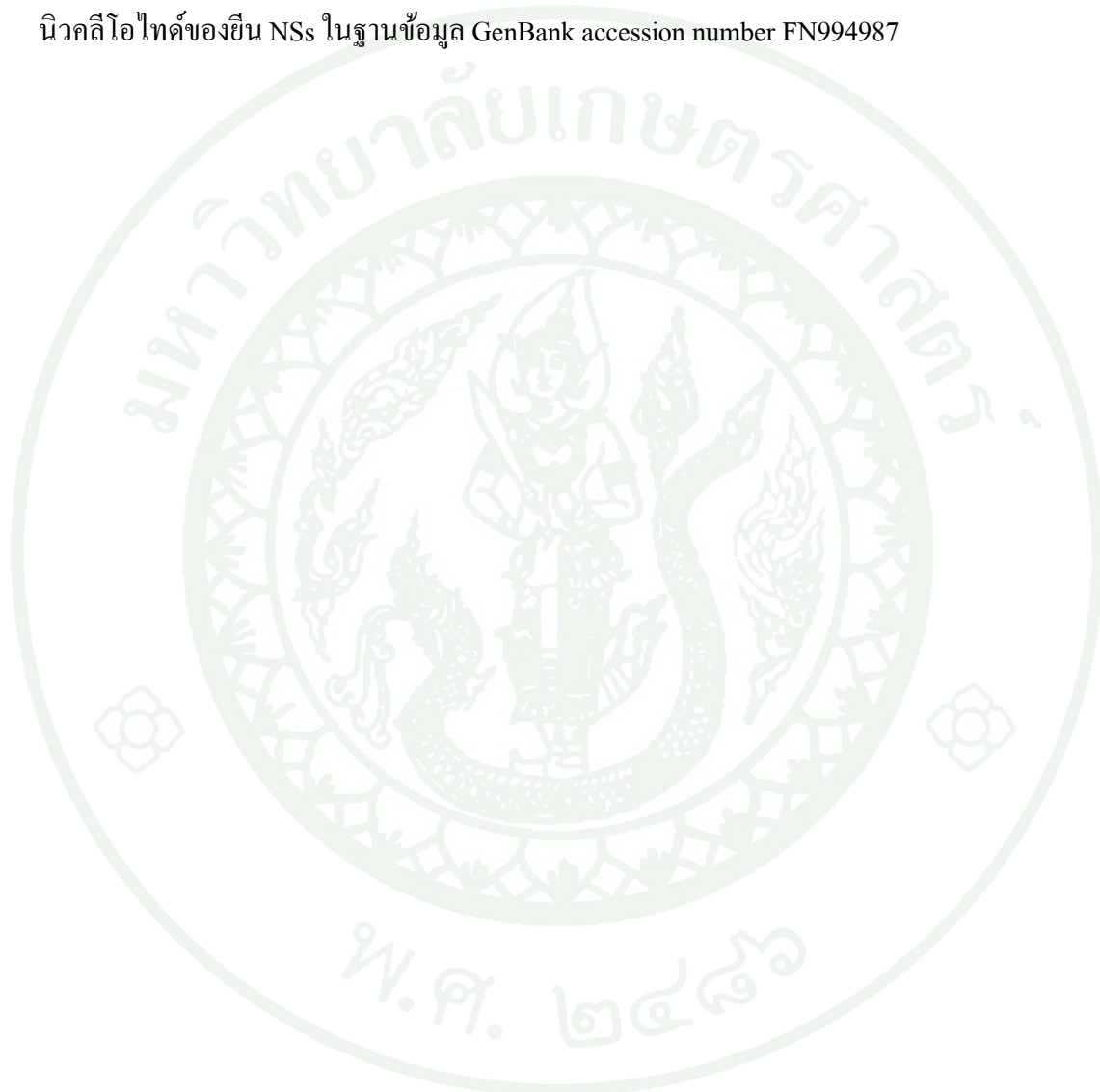
2.1 ยีน N

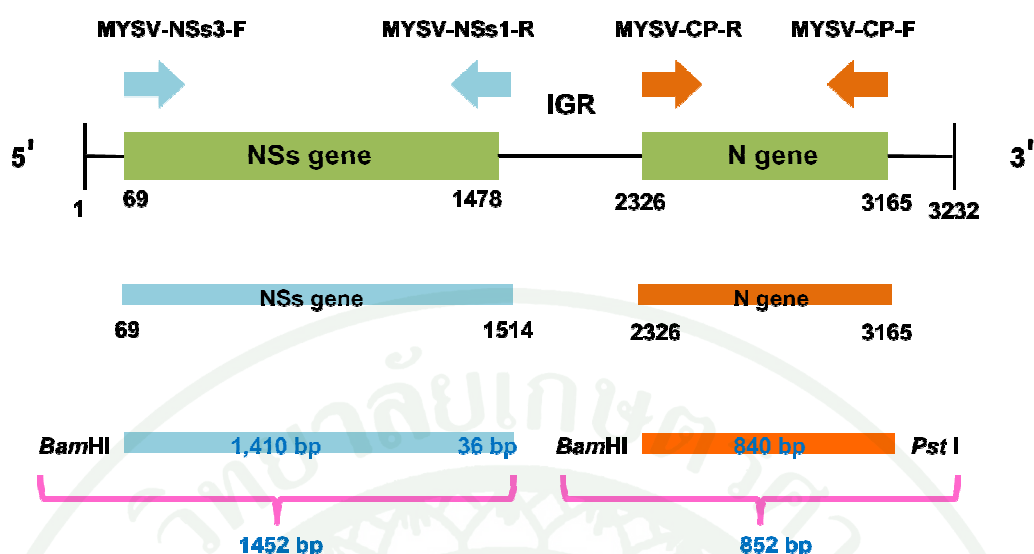
ดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากสายไพรเมอร์ MYSV-CP-R และ MYSV-CP-F มีขนาด 852 คู่เบส (ภาพที่ 3 และ 4) เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว พบว่าเป็นยีน N ของเชื้อ MYSV ที่มีความยาว 840 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งครอบคลุมรหัสเริ่มต้น (ATG) ถึงรหัสหยุด (TAA) ของโปรตีนในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 2326-3165 โดยมีรหัสของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI (GGATCC) ที่ตำแหน่งก่อนรหัสเริ่มต้นของโปรตีน และ *Pst*I (CTGCAG) ที่ตำแหน่งหลังรหัสหยุดของโปรตีน ยีน N แปลรหัสได้กรดอะมิโน 280 เรซิดิวส์ มีน้ำหนักโมเลกุลที่คำนวณได้เท่ากับ 31.159 กิโลดาลตัน (CLC Main Workbench 5) บันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน N ในฐานข้อมูล GenBank accession number FR714507

2.2 ยีน NSs

ดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากสายไพรเมอร์ MYSV-NSs1-R และ MYSV-NSs3-F มีขนาด 1,452 คู่เบส (ภาพที่ 3 และ 5) เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าเป็นยีน NSs ของเชื้อ

MYSV ที่มีความยาว 1,410 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งครอบคลุมรหัสเริ่มต้น (ATG) ถึงรหัสหยุด (TAA) ของโปรตีน ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 69-1478 และเป็นส่วน intergenic region (IGR) 36 นิวคลีโอไทด์ โดยมีตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI (GGATCC) ที่ตำแหน่งก่อนรหัสเริ่มต้นของโปรตีน ยีน NSs แปลรหัสได้โปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 470 เรซิดิวส์ มีน้ำหนักโมเลกุลที่คำนวณได้เท่ากับ 53.169 กิโลดาลตัน (CLC Main Workbench 5) บันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NSs ในฐานข้อมูล GenBank accession number FN994987





ภาพที่ 3 แผนภาพแสดงตำแหน่งและขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จาก RNA รวมของพืชที่ติดเชื้อ Melon yellow spot virus (MYSV) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน

Nucleocapsid (N) และ Non-Structural (NSs)

NSs gene non-structural gene

N gene nucleocapsid gene

IGR intergenic region

MYSV-NSs3-F ไพรเมอร์ forward ของยีน NSs ของเชื้อ MYSV

MYSV-NSs1-R ไพรเมอร์ reverse ของยีน NSs ของเชื้อ MYSV

MYSV-CP-F ไพรเมอร์ forward ของยีน N ของเชื้อ MYSV

MYSV-CP-R ไพรเมอร์ reverse ของยีน N ของเชื้อ MYSV

*Bam*HI เอนไซม์ตัดจำเพาะ

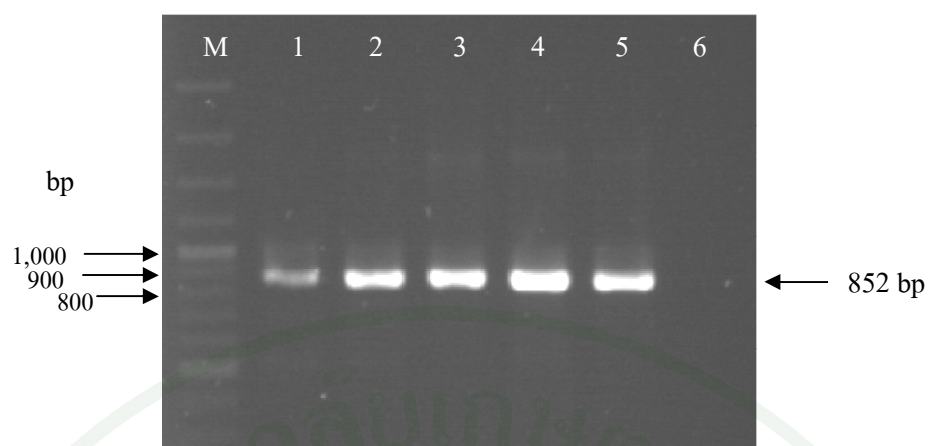
*Pst*I เอนไซม์ตัดจำเพาะ

ลูกศรสีฟ้าแสดงทิศทางการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของไพรเมอร์ MYSV-NSs3-F และ MYSV-NSs1-R

ลูกศรสีส้มแสดงทิศทางการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของไพรเมอร์ MYSV-NSs3-F และ MYSV-NSs1-R

ตัวเลขสีดำแสดงตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์

ตัวเลขสีน้ำเงินแสดงจำนวนนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตดีเอ็นเอ

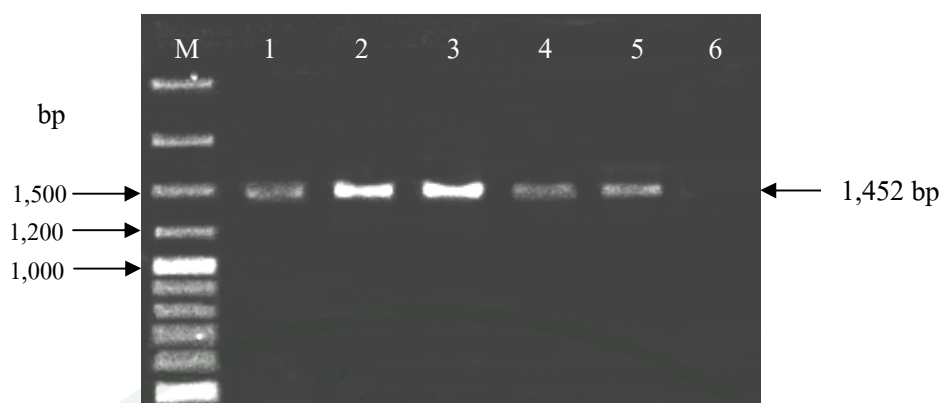


ภาพที่ 4 เจลแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 852 คู่เบส ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน N ของเชื้อ Melon yellow spot virus ไอโซเลต MYSV-SUT ด้วยเทคนิค two-step RT-PCR ใช้ โพรเมอร์ MYSV-CP-F และ MYSV-CP-R และใช้อาร์เอ็นเอรวมจากใบเมลอนเป็นต้นแบบ แยกขนาดดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis

ช่อง M ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Fermentas)

ช่อง 1-5 ใบเมลอน ตัวอย่างที่ 1-5

ช่อง 6 น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ



ภาพที่ 5 เจลแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 1,452 คู่เบส ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้น NSs ของเชื้อ Melon yellow spot virus ไอโซเลต MYSV-SUT ด้วยเทคนิค two-step RT-PCR ใช้ ไพรมเมอร์ MYSV-NSs3-F และ MYSV-NSs1-R และใช้อาร์เอ็นเอรวมจากใบเมลอนเป็น ต้นแบบ แยกขนาดดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis

ช่อง M ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Fermentas)

ช่อง 1-5 ใบเมลอน ตัวอย่างที่ 1-5

ช่อง 6 น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ

3. การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีนและโปรตีน N

3.1 เปรียบเทียบกับเชื้อ MYSV ไอโซเลตต่างๆ

เชื้อ MYSV-SUT มีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์กับเชื้อ MYSV ไอโซเลตอื่นๆ ที่ระดับ 96.6-99.2 เปอร์เซ็นต์ โดยคล้ายคลึงกับไอโซเลต WS1 ซึ่งแยกได้จากแตงโมในประเทศไทยมากที่สุด และมีความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน N กับเชื้อ MYSV ไอโซเลตอื่นๆ ที่ระดับ 98.9-100 เปอร์เซ็นต์ โดยคล้ายคลึงกับไอโซเลต W3-Kalasin และ Ph122 ซึ่งแยกได้จากแตงโมและโองเทงในประเทศไทย และ Tospo-melo ซึ่งแยกได้จากเมลอนในประเทศไทยญี่ปุ่นมากที่สุดที่ระดับ 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4)

3.2 เปรียบเทียบกับเชื้อทอสโพอไวรัสชนิดอื่นที่พบในประเทศไทย ญี่ปุ่น และไต้หวัน

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน N ของเชื้อ MYSV-SUT มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ WSMoV, CaCV และ TNRV ที่ระดับ 61.8-62.1, 60.3-61.1 และ 56.2-56.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน N กับเชื้อ WSMoV, CaCV และ TNRV ที่ระดับ 57.5-57.9, 58.2-58.9 และ 50.9-51.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วย Phylogenetic tree โดยใช้การวิเคราะห์แบบ UPGMA จากข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน N ของเชื้อ MYSV, WSMoV, CaCV และ TNRV ไอโซเลตต่างๆ พบว่าสามารถจำแนกเชื้อไวรัสออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มของเชื้อ MYSV, TNRV และเชื้อทอสโพอไวรัสชิโรกรูป WSMoV ซึ่งประกอบด้วยเชื้อ WSMoV และ CaCV โดยแบ่งเป็นกลุ่มย่อยที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดระหว่างเชื้อชนิดเดียวกันแต่ต่างไอโซเลตกัน สำหรับเชื้อ MYSV แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อยของไอโซเลต Tospo-melo กับ SUT กลุ่มย่อยของไอโซเลต C95S และ B07T และไอโซเลต TW ซึ่งแยกออกมาเป็นไอโซเลตเดี่ยว (ภาพที่ 6)

จะเห็นว่าเชื้อทอสโพอไวรัสแต่ละชนิดจะมีความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีนและโปรตีน N มากที่สุดภายในเชื้อเดียวกันแต่ต่างไอโซเลต และยังพบว่าเชื้อ WSMoV มีความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน N มากที่สุดกับเชื้อ CaCV ที่ระดับ 84.4-85.5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5) สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วย Phylogenetic tree ที่มีการจัดกลุ่มของเชื้อ WSMoV และ CaCV อยู่ในกลุ่มเดียวกัน (ภาพที่ 6) แสดงให้เห็นว่าเชื้อ WSMoV มี

ความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อ CaCV มากที่สุด Phylogenetic tree ที่วิเคราะห์จากลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน N แสดงให้เห็นว่าเชื้อ MYSV ไอโซเลท SUT มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับไอโซเลท Tospo-melo มากที่สุด และไอโซเลท C95S มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับไอโซเลท B07T มากที่สุด ส่วนไอโซเลท TW ถูกจัดแยกออกมาเป็นไอโซเลทเดี่ยว ซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับกลุ่มย่อยของไอโซเลท SUT และ Tospo-melo มากกว่ากลุ่มย่อยของไอโซเลท C95S และ B07T อีกทั้งยังพบว่าเชื้อ MYSV มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อในซีโรกรุ๊ป WSMoV มากกว่าเชื้อ TNRV เช่นเดียวกับรายงานของคณินิจ (2553) (ภาพที่ 6)

4. การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีนและโปรตีน NSs

4.1 เปรียบเทียบกับเชื้อ MYSV ไอโซเลทต่างๆ

เชื้อ MYSV-SUT มีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NSs กับไอโซเลท Tospo-melo มากที่สุดที่ระดับ 97.8 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ไอโซเลท TW, C95S และ B07T ที่ระดับ 97.6, 95.7 และ 95.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NSs คล้ายคลึงกับเชื้อ MYSV ไอโซเลท TW มากที่สุดที่ระดับ 97.7 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ไอโซเลท Tospo-melo, C95S และ B07T ที่ระดับ 97.0, 96.0 และ 95.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และไอโซเลท B07T มีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนและโปรตีน NSs กับไอโซเลท C95S มากที่สุด ที่ระดับ 99.7 และ 99.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

4.2 เปรียบเทียบกับเชื้อทอสโปไวรัสชนิดอื่นที่พบในประเทศไทย ญี่ปุ่น และไต้หวัน

เชื้อ MYSV-SUT มีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NSs กับเชื้อ WSMoV, CaCV และ TNRV ที่ระดับ 55.7-56.1, 54.2-56.2 และ 51.6-51.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NSs กับเชื้อ WSMoV, CaCV และ TNRV ที่ระดับ 47.5-48.5, 44.7-46.2 และ 42.3-42.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วย Phylogenetic tree โดยใช้การวิเคราะห์แบบ UPGMA จากข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NSs ของเชื้อ MYSV, WSMoV, CaCV และ TNRV ไอโซเลทต่างๆ พบว่าสามารถจำแนกเชื้อไวรัสออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มของเชื้อ MYSV กลุ่มของเชื้อ TNRV และกลุ่มของเชื้อทอสโปไวรัสซีโรกรุ๊ป WSMoV ซึ่งประกอบด้วยเชื้อ

WSMoV และ CaCV โดยแบ่งเป็นกลุ่มย่อยที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดระหว่างเชื้อเดียวกันแต่ต่างไอโซเลต สำหรับเชื้อ MYSV แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อยของไอโซเลต TW กับ Tospo-melo กลุ่มย่อยของไอโซเลต C95S และ B07T และไอโซเลต SUT ซึ่งแยกออกมาเป็นไอโซเลตเดี่ยว (ภาพที่ 7)

จะเห็นว่าเชื้อทอสปอไวรัสแต่ละชนิดจะมีความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีนและโปรตีน NSs มากที่สุดภายในเชื้อเดียวกันแต่ต่างไอโซเลต และเชื้อ WSMoV มีความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NSs มากที่สุดกับเชื้อ CaCV ที่ระดับ 78.2-81.6 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6) สอดคล้องกับการวิเคราะห์ด้วยโปรตีน N ผลของ Phylogenetic tree แสดงการจัดกลุ่มของเชื้อ MYSV, TNRV และเชื้อในซีโรกรุป WSMoV สอดคล้องกับการวิเคราะห์ด้วยโปรตีน N แต่มีความแตกต่างของการจัดกลุ่มย่อยของเชื้อ MYSV โดยพบว่าเชื้อ MYSV ไอโซเลต TW มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับไอโซเลต Tospo-melo มากที่สุด ส่วนไอโซเลต SUT ถูกจัดแยกออกมาเป็นไอโซเลตเดี่ยว ซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับกลุ่มย่อยของไอโซเลต TW และ Tospo-melo มากกว่ากลุ่มย่อยของไอโซเลต C95S และ B07T (ภาพที่ 7) แสดงให้เห็นว่าลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NSs สามารถใช้ในการจำแนกเชื้อ MYSV ไอโซเลต SUT ออกจากไอโซเลต TW ซึ่งแยกจากแดงโมในประเทศไต้หวัน และ Tospo-melo แยกจากเมลอนในประเทศญี่ปุ่นได้ดีกว่าลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน N และพบว่าเชื้อ WSMoV มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อ CaCV มากที่สุด และเชื้อ TNRV มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อในซีโรกรุป WSMoV มากกว่าเชื้อ MYSV แตกต่างจากโปรตีน N เช่นเดียวกับรายงานของคินีจ (2553) (ภาพที่ 7)

จากผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีนและโปรตีน N และ NSs รวมถึงผลการวิเคราะห์ด้วย phylogenetic tree จะเห็นว่ายีนและโปรตีน NSs สามารถใช้ในการจำแนกเชื้อ MYSV ออกจากเชื้อทอสปอไวรัสชนิดอื่นได้ชัดเจนกว่ายีนและโปรตีน N (ตารางที่ 7) ทั้งนี้เนื่องจากยีน N มีบริเวณอนุรักษ์ (conserved sequence) ที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างห่อหุ้มสารพันธุกรรม รวมถึงเกี่ยวข้องกับกระบวนการถอดรหัสเพื่อเพิ่มปริมาณอาร์เอ็นเอของไวรัสและอาจเป็นตัวยับยั้งการเพิ่มปริมาณอาร์เอ็นเอของไวรัสถ้าโครงสร้างโปรตีน N เปลี่ยนแปลงไป (Richmond *et al.*, 1998; Whitfield *et al.*, 2005) จึงมีความหลากหลายภายในเชื้อชนิดเดียวกันแต่ต่างไอโซเลตกันน้อยกว่ายีน NSs

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีนและโปรตีน Nucleocapsid (N) ของเชื้อ Melon yellow spot virus ไอโซเลต SUT (MYSV-SUT) กับเชื้อ Melon yellow spot virus ไอโซเลตต่างๆ ที่พบในประเทศไทย, ญี่ปุ่น และไต้หวัน เปรียบเทียบแบบ Multiple alignment ด้วยโปรแกรม CLC Main Workbench 5 (CLC bio)

กรดอะมิโน นิวคลีโอไทด์	SUT	WS1	W3- Kalasin	Ph122	JTC	W6422	WG17	Tospo-melo	TW	M7	Luffah 13	B07T	C95S	Kochi- Haruno
SUT		99.6	100.0	100.0	99.3	99.6	99.6	100.0	98.9	99.6	98.9	98.9	98.9	98.9
WS1	99.2		99.6	99.6	99.6	99.3	99.3	99.6	98.6	99.3	98.6	98.6	98.6	98.6
W3-Kalasin	99.1	98.9		100.0	99.3	99.6	99.6	100.0	98.9	99.6	98.9	98.9	98.9	98.9
Ph122	99.1	98.9	99.8		99.3	99.6	99.6	100.0	98.9	99.6	98.9	98.9	98.9	98.9
JTC	99.1	98.9	99.1	99.1		98.9	98.9	99.3	98.2	98.9	98.2	98.2	98.2	98.2
W6422	98.9	98.8	99.6	99.6	98.9		99.3	99.6	98.6	99.3	98.6	98.6	98.6	98.6
WG17	98.9	98.6	98.9	98.9	98.9	98.8		99.6	98.6	99.3	98.6	98.6	98.6	98.6
Tospo-melo	98.5	98.3	98.7	98.7	98.5	98.6	98.3		98.9	99.6	98.9	98.9	98.9	98.9
TW	98.0	97.9	98.2	98.2	98.0	98.1	98.1	98.8		98.6	98.2	98.2	98.2	98.2
M7	97.9	98.0	98.1	98.1	97.9	98.0	98.2	98.9	98.5		98.6	98.6	98.6	98.6
Luffah 13	96.6	96.4	96.6	96.6	96.3	96.4	96.4	97.1	96.7	96.8		100.0	100.0	100.0
B07T	96.6	96.4	96.6	96.6	96.3	96.4	96.4	97.1	96.7	96.8	96.8		100.0	100.0
C95S	96.6	96.4	96.6	96.6	96.3	96.4	96.4	97.1	96.7	96.8	96.8	100.0		100.0
Kochi-Haruno	96.6	96.4	96.6	96.6	96.3	96.4	96.4	97.1	96.7	96.8	96.8	100.0	100.0	

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีนและโปรตีน Nucleocapsid (N) ของเชื้อ Melon yellow spot virus ไอโซเลท SUT (MYSV-SUT) กับเชื้อทอสปอไวรัสไอโซเลทต่างๆ ที่พบในประเทศไทย, ญี่ปุ่น และไต้หวัน เปรียบเทียบแบบ Multiple alignment ด้วยโปรแกรม CLC Main Workbench 5 (CLC bio)

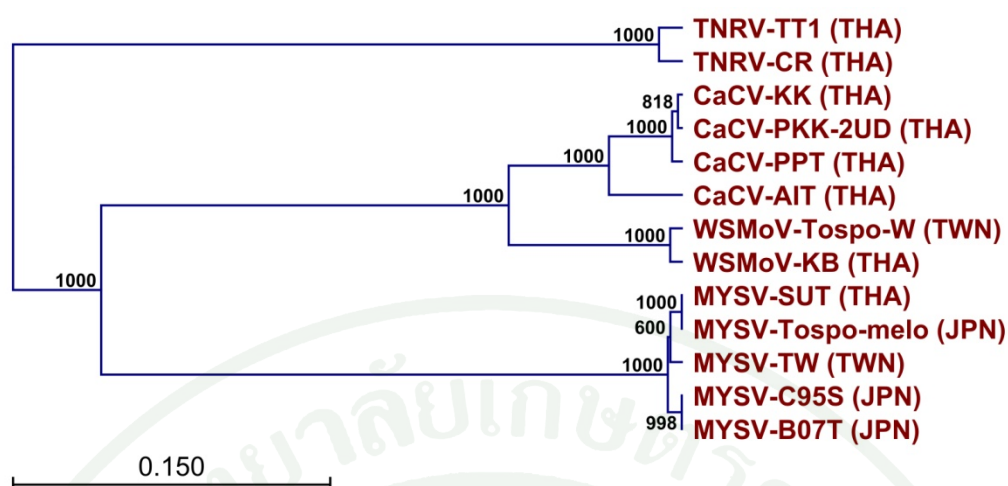
กรดอะมิโน นิวคลีโอไทด์	MYSV- SUT	MYSV- Tospo- melo	MYSV- TW	MYSV- B07T	MYSV- C95S	CaCV- KK	CaCV- NRA	CaCV- PKK- 2UD	CaCV- PPT	CaCV- AIT	WSMoV- KB	WSMoV- Tospo-W	TNRV- CR	TNRV- TT1
MYSV-SUT		100.0	98.9	98.9	98.9	58.6	58.2	58.6	58.9	58.6	57.9	57.5	50.9	51.2
MYSV-Tospo-melo	98.5		98.9	98.9	98.9	58.6	58.2	58.6	58.9	58.6	57.9	57.5	50.9	51.2
MYSV-TW	98.0	98.8		98.2	98.2	58.6	58.2	58.6	58.9	58.6	57.9	57.5	50.9	51.2
MYSV-B07T	96.6	97.1	96.7		100.0	58.6	58.6	58.6	58.9	58.9	57.9	57.5	50.5	50.9
MYSV-C95S	96.6	97.1	96.7	100.0		58.6	58.6	58.6	58.9	58.9	57.9	57.5	50.5	50.9
CaCV-KK	60.5	60.9	61.5	60.6	60.6		91.7	100.0	99.3	93.5	85.1	85.1	57.1	57.5
CaCV-NRA	60.3	60.8	61.4	60.5	60.5	99.4		91.7	91.3	97.1	85.5	85.5	56.7	57.8
CaCV-PKK-2UD	60.3	60.8	61.4	60.5	60.5	99.9	99.3		99.3	93.5	85.1	85.1	57.1	57.5
CaCV-PPT	60.9	61.4	62.0	61.1	61.1	98.7	98.3	98.6		93.5	84.4	84.4	56.4	56.7
CaCV-AIT	61.1	61.2	61.6	61.2	61.2	85.1	85.1	85.0	84.8		85.5	85.5	56.7	57.8
WSMoV-KB	62.1	62.2	62.7	62.6	62.6	77.8	77.8	77.7	77.3	79.1		98.9	55.0	55.7
WSMoV-Tospo-W	61.8	61.8	62.1	62.1	62.1	77.2	76.9	77.1	76.9	78.5	96.4		54.6	55.3
TNRV-CR	56.5	57.2	57.4	56.9	56.9	61.0	60.8	60.9	60.9	59.2	58.4	58.3		97.9
TNRV-TT1	56.2	56.9	57.0	56.8	56.8	61.2	61.0	61.1	61.1	58.9	58.8	59.0	96.5	

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของโปรตีน Non-Structural (NSs) ของเชื้อ Melon yellow spot virus ไอโซเลต SUT (MYSV-SUT) กับเชื้อทอสปอไวรัสไอโซเลตต่างๆ ที่พบในประเทศไทย, ญี่ปุ่น และไต้หวัน เปรียบเทียบแบบ Multiple alignment ด้วยโปรแกรม CLC Main Workbench 5 (CLC bio)

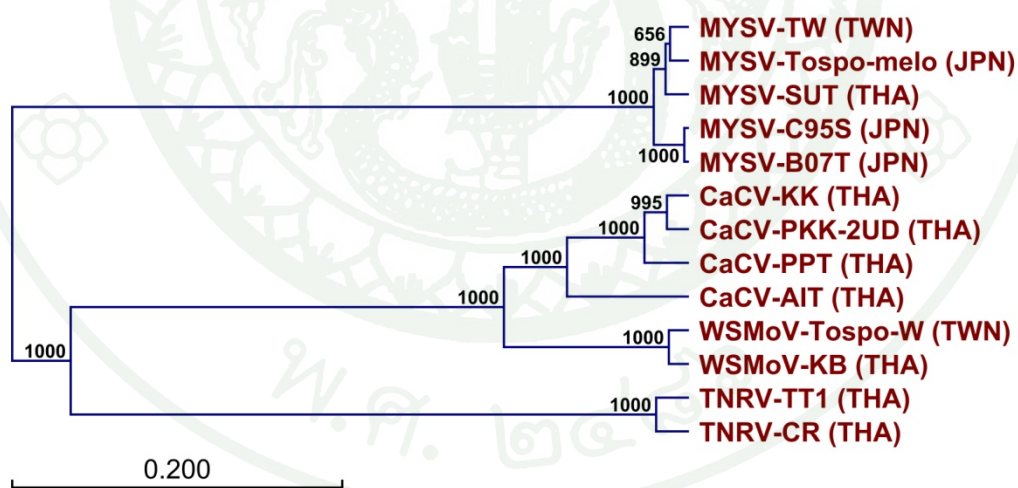
กรดอะมิโน นิวคลีโอไทด์	MYSV- SUT	MYSV- Tospo- melo	MYSV- TW	MYSV- B07T	MYSV- C95S	CaCV- KK	CaCV- NRA	CaCV- PKK- 2UD	CaCV- PPT	CaCV- AIT	WSMoV- KB	WSMoV- Tospo-W	TNRV- CR	TNRV- TT1
MYSV-SUT		97.0	97.7	95.5	96.0	46.2	46.2	45.5	44.9	46.0	48.5	47.5	42.3	42.6
MYSV-Tospo-melo	97.8		97.9	96.0	96.4	46.0	46.0	45.3	44.9	45.5	48.3	47.2	43.0	43.2
MYSV-TW	97.6	98.1		95.7	96.2	46.0	46.0	45.3	44.7	45.5	48.5	47.5	42.1	42.6
MYSV-B07T	95.4	95.8	95.8		99.6	45.1	45.3	44.5	44.2	45.1	47.8	46.6	42.6	43.0
MYSV-C95S	95.7	96.0	96.0	99.7		45.3	45.5	44.7	44.5	45.1	47.8	46.6	42.6	43.0
CaCV-KK	55.9	56.2	56.2	55.9	56.0		99.3	97.5	95.0	87.5	81.4	80.9	49.1	49.1
CaCV-NRA	55.7	55.9	55.9	55.6	55.7	99.1		96.8	94.8	88.0	81.6	81.1	49.3	49.3
CaCV-PKK-2UD	56.2	56.4	56.4	56.1	56.2	98.3	97.6		94.8	86.6	80.2	80.0	49.1	48.7
CaCV-PPT	56.2	56.3	56.4	56.2	56.3	96.6	96.3	96.6		85.2	78.6	78.2	48.2	48.2
CaCV-AIT	54.2	54.0	54.1	53.9	53.8	82.4	82.8	82.0	82.6		80.7	81.1	48.0	48.0
WSMoV-KB	56.1	56.4	56.7	55.7	55.7	78.0	78.0	77.8	77.4	77.7		97.7	47.6	47.6
WSMoV-Tospo-W	55.7	55.8	55.9	55.1	55.1	77.7	77.7	77.4	77.2	77.9	97.4		47.6	47.6
TNRV-CR	51.7	51.9	51.9	51.7	51.7	57.5	57.2	57.2	56.9	56.2	54.6	54.1		96.2
TNRV-TT1	51.6	51.8	51.7	51.9	51.8	57.0	56.8	56.8	56.4	56.5	54.0	54.0	95.1	

ตารางที่ 7 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ ยีนและโปรตีน Nucleocapsid (N) และ Non-Structural (NSs) ของเชื้อ Melon yellow spot virus ไอโซเลต SUT (MYSV-SUT) กับเชื้อทอสมโฟไวรัสไอโซเลตต่างๆ ที่พบในประเทศไทย ญี่ปุ่น และไต้หวัน

เชื้อไวรัส	ความคล้ายคลึงของยีนและโปรตีน		ความคล้ายคลึงของยีนและโปรตีน	
	N (เปอร์เซ็นต์)		NSs (เปอร์เซ็นต์)	
	นิวคลีโอไทด์	กรดอะมิโน	นิวคลีโอไทด์	กรดอะมิโน
MYSV-Tospo-melo	98.5	100.0	97.8	97.0
MYSV-TW	98.0	98.9	97.6	97.0
MYSV-B07T	96.6	98.9	95.4	97.7
MYSV-C95S	96.6	98.9	95.7	95.5
CaCV-KK	60.5	58.6	55.9	46.2
CaCV-NRA	60.3	58.2	55.7	46.2
CaCV-PKK-2UD	60.3	58.6	56.2	45.5
CaCV-PPT	60.9	58.9	56.2	44.9
CaCV-AIT	61.1	58.6	54.2	46.0
WSMoV-KB	62.1	57.9	56.1	48.5
WSMoV-Tospo-W	61.8	57.5	55.7	47.5
TNRV-CR	56.6	50.9	51.7	42.3
TNRV-TT1	56.2	51.2	51.6	42.6



ภาพที่ 6 Phylogenetic tree ของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Nucleocapsid (N) ของเชื้อ Melon yellow spot virus ไอโซเลต SUT (MYSV-SUT) กับเชื้อทอสโปไวรัสไอโซเลตต่างๆ ที่พบในประเทศไทย (THA) ญี่ปุ่น (JPN) และไต้หวัน (TWN) โดยใช้การวิเคราะห์แบบ UPGMA ด้วยโปรแกรม CLC Main Workbench 5 (CLC bio) จำนวนค่า Bootstrap percentage จาก 1,000 Replications



ภาพที่ 7 Phylogenetic tree ของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Non-Structural (NSs) ของเชื้อ Melon yellow spot virus ไอโซเลต SUT (MYSV-SUT) กับเชื้อทอสโปไวรัสไอโซเลตต่างๆ ที่พบในประเทศไทย (THA) ญี่ปุ่น (JPN) และไต้หวัน (TWN) โดยใช้การวิเคราะห์แบบ UPGMA ด้วยโปรแกรม CLC Main Workbench 5 (CLC bio) จำนวนค่า Bootstrap percentage จาก 1,000 replications

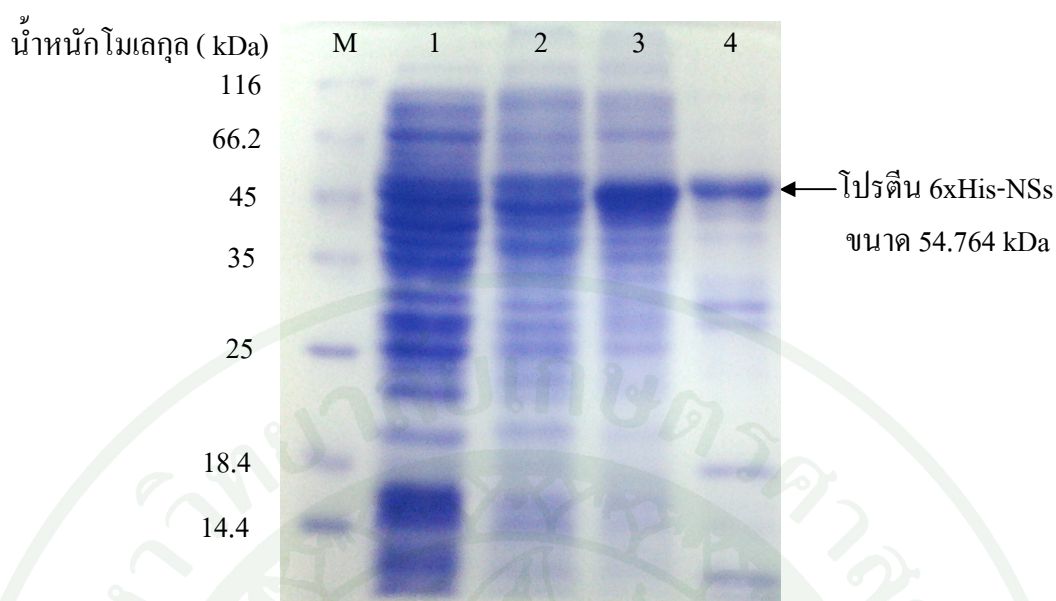
5. โปรตีน NSs ของเชื้อ Melon yellow spot virus ไอโซเลต SUT (MYSV-SUT) ที่สังเคราะห์ได้ในสภาพหลอดทดลอง

โปรตีนลูกผสมของ Histidine และ NSs (6xHis-NSs) บริสุทธิ์ที่ถูกชะล้างออกจาก Ni-NTA column มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 54.764 กิโลดาลตัน โดยที่โปรตีน 6xHis มีน้ำหนักประมาณ 1 กิโลดาลตัน และโปรตีน NSs มีน้ำหนักประมาณ 53.764 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 8 และ 9) มีความเข้มข้น 1.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 10) ใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลโปรตีน NSs ของเชื้อ MYSV-SUT ที่คำนวณจากลำดับกรดอะมิโนซึ่งเท่ากับ 53.169 กิโลดาลตัน (CLC Main Workbench 5)

พบว่าการปนเปื้อนของโปรตีนอื่นๆที่มีขนาดเล็กกว่าโปรตีนเป้าหมาย (6xHis-NSs) โดยโปรตีนที่ปนเปื้อนมานั้นอาจเป็นโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs ที่เกิดการ degrade ในขั้นตอนการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน หรือขั้นตอนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ เนื่องจากทำภายใต้สภาวะแบบ denaturing และล้างออกไปไม่หมด หรืออาจเป็นโปรตีนที่สังเคราะห์ไม่สมบูรณ์ ซึ่งจะมีส่วนของ 6xHis-tagged เชื่อมต่อด้วยอยู่ทำให้สามารถจับกับ Ni-NTA ได้ดีเช่นเดียวกับโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs ที่สมบูรณ์ จึงล้างออกไปได้ยาก ดังนั้นโปรตีนเหล่านี้จึงถูก elute ออกมากับโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs ด้วย (QIAGEN) โปรตีนปนเปื้อนนี้นั้นส่วนหนึ่งมาจากการใช้ lysis buffer และ wash buffer ที่ไม่เหมาะสม ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปจึงควรมีการปรับปรุงการเลือกใช้ buffer ให้เหมาะสม เพื่อให้ได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้น

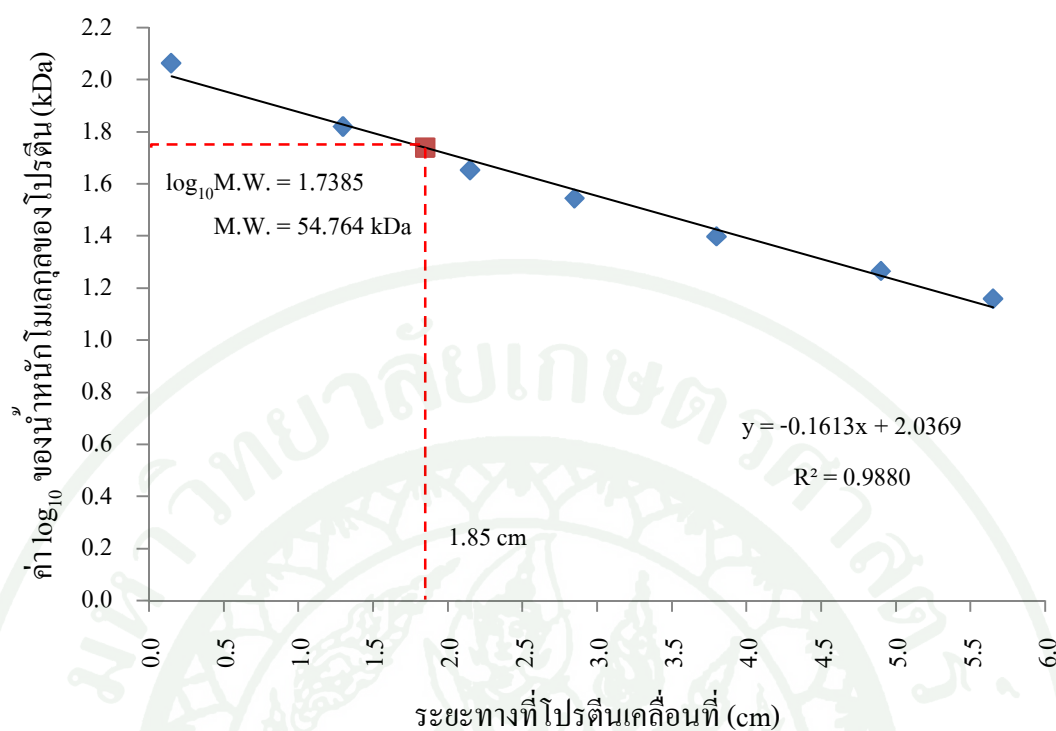
6. ค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อโปรตีน NSs

จากการผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีน NSs ของเชื้อ MYSV (PAb-MYSV-NSs) ในกระด้ายแล้วเก็บแอนติซีรั่มทั้ง 5 ครั้ง มาตรวจหาค่าไตเตอร์ พบว่าแอนติซีรั่มที่ได้ให้ค่าไตเตอร์ในการทำปฏิกิริยาในช่วง 800 ถึง 3,200 โดยค่าไตเตอร์จากการเจาะเลือดครั้งที่ 3, 4 และ 5 (3,200) สูงกว่าครั้งที่ 1 และ 2 (800 และ 1,600 ตามลำดับ) และได้เลือกแอนติซีรั่มจากการเจาะเลือดครั้งที่ 4 เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป เนื่องจากมีค่าไตเตอร์สูง (3,200) และให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับแอนติซีรั่มทั้ง 5 ครั้ง ที่ค่าความเจือจาง 1:3,200 (ตารางที่ 8, ภาพที่ 11)

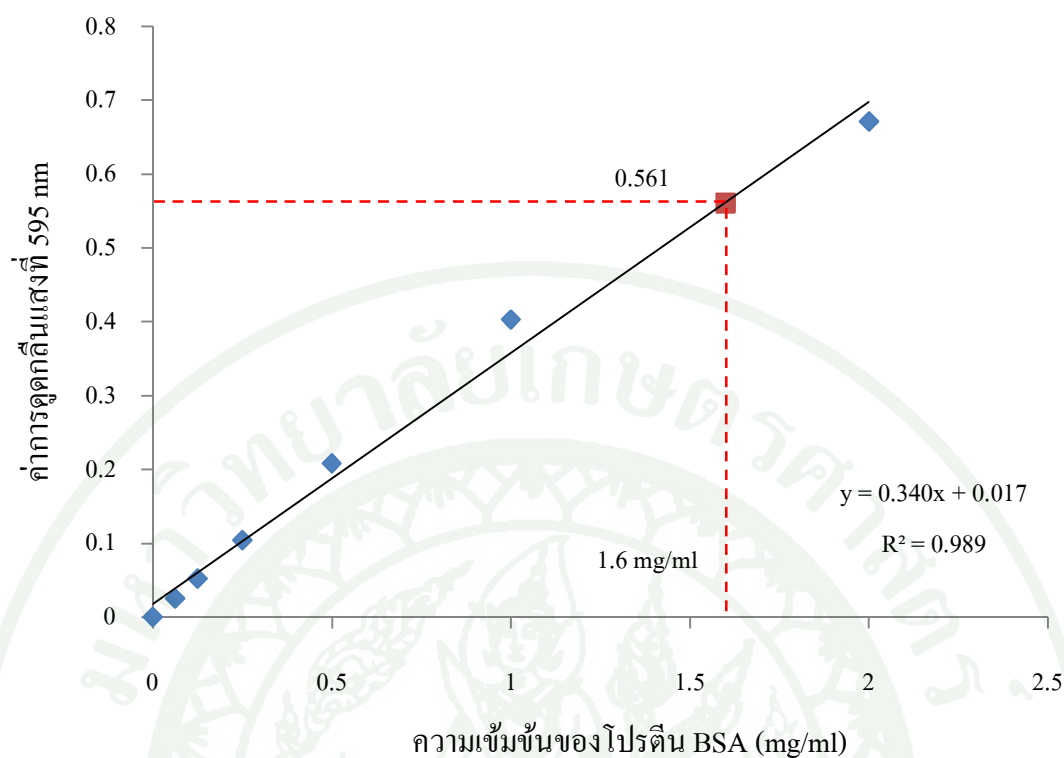


ภาพที่ 8 เจลแสดงแถบโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs ของเชื้อ Melon yellow spot virus ไอโซเลท SUT (MYSV-SUT) ที่สังเคราะห์ได้ในเซลล์ *E. coli* DH5 α เมื่อสกัดโปรตีนจากเซลล์ *E. coli* ในสภาวะ denaturing condition และทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยผ่าน Ni-NTA column ตรวจสอบด้วย 12% SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis ย้อมสีด้วย staining solution (0.2% Coomassie brilliant blue R250) และล้างออกด้วย Destaining solution จนกว่าจะเห็นแถบโปรตีน

- | | |
|--------|---|
| ช่อง M | โปรตีนมาตรฐาน (Fermentas) SM0431 |
| ช่อง 1 | โปรตีนจากเซลล์ <i>E. coli</i> DH5 α ที่เลี้ยงในอาหาร 2xYT |
| ช่อง 2 | โปรตีนจากเซลล์ <i>E. coli</i> DH5 α ที่มีพลาสมิด pQE-80L สายผสมของยีน NSs ที่ไม่ได้ชักนำให้มีการสังเคราะห์โปรตีน |
| ช่อง 3 | โปรตีนจากเซลล์ <i>E. coli</i> DH5 α ที่มีพลาสมิด pQE-80L สายผสมของยีน NSs ที่ชักนำให้สังเคราะห์โปรตีนด้วย IPTG นาน 8 ชั่วโมง |
| ช่อง 4 | โปรตีนจากเซลล์ <i>E. coli</i> DH5 α ที่มีพลาสมิด pQE-80L สายผสมของยีน NSs ที่ชักนำให้สังเคราะห์โปรตีนด้วย IPTG นาน 8 ชั่วโมง ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน Ni-NTA column |



ภาพที่ 9 Calibration curve ที่สร้างขึ้นจากระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่ (cm) และค่า $\log_{10}$ ของน้ำหนักโมเลกุล (kDa) ของโปรตีนมาตรฐาน (Fermentas) SM0431 แยกขนาดโปรตีนด้วย 12% SDS Polyacrylamide gel electrophoresis และโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs เคลื่อนที่ได้ระยะทาง 1.85 cm ซึ่งเทียบกับค่า $\log_{10}$ ของน้ำหนักโมเลกุลได้ประมาณ 1.7385 คำนวณน้ำหนักโมเลกุลได้ประมาณ 54.764 kDa



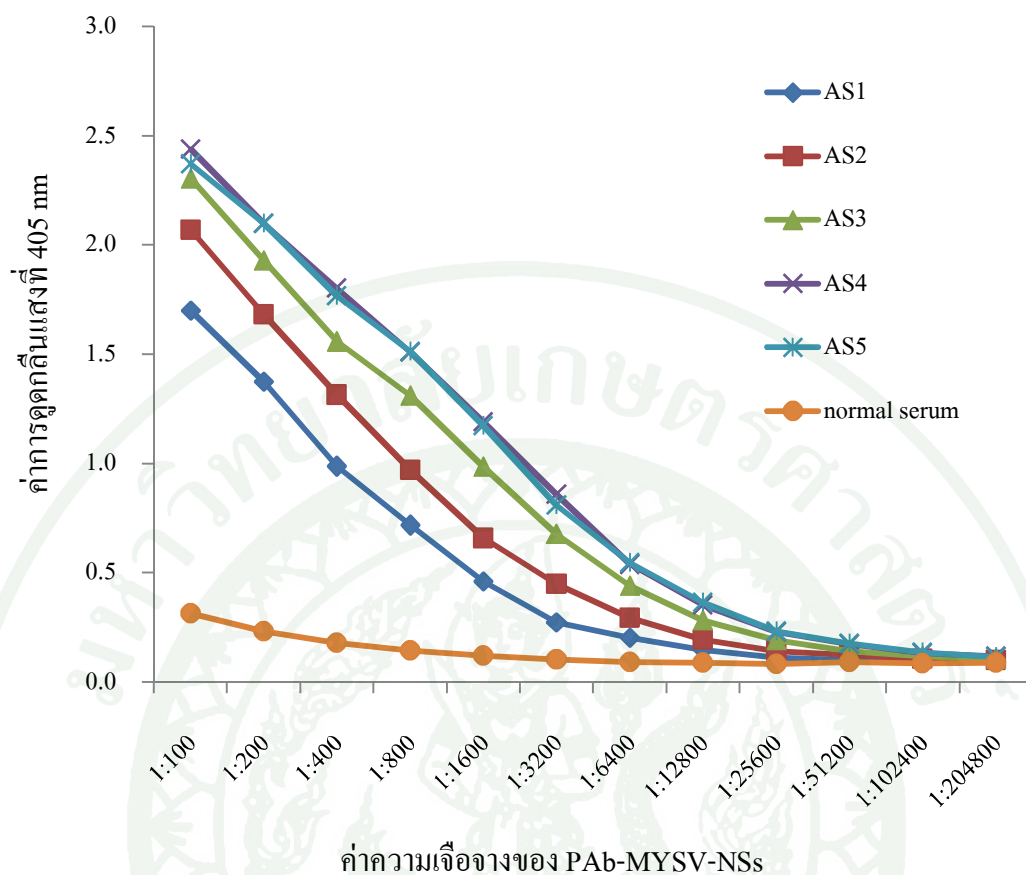
ภาพที่ 10 Standard curve ที่สร้างขึ้นจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm ของโปรตีน BSA ที่ทราบความเข้มข้น (ตั้งแต่ 0.0625-2 mg/ml) วัดด้วยวิธี Bradford's เพื่อหาความเข้มข้นของโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs ที่แยกให้บริสุทธิ์ ซึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 0.561 คิดเป็นความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 1.6 mg/ml

ตารางที่ 8 ค่าความเจือจางสูงสุด (dilution end point) ของแอนติซีรัม PAb-MYISV-NSs ที่ทำปฏิกิริยากับโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs ความเข้มข้น 3 µg/ml ซึ่งเป็นแอนติเจน ตรวจสอบด้วยเทคนิค DAC-ELISA

ค่าความเจือจาง ของแอนติซีรัม	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm เมื่อใช้แอนติซีรัมจากการเจาะเลือดครั้งที่ 1-5					
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	Normal serum
1: 100	1.699 ^{1/}	2.068	2.303	2.437	2.370	0.314 ^{2/}
1: 200	1.374	1.681	1.928	2.099	2.098	0.231
1: 400	0.986	1.314	1.557	1.802	1.767	0.179
1: 800	0.716	0.969	1.310	1.509	1.511	0.143
1: 1600	0.460	0.657	0.985	1.190	1.171	0.121
1: 3200	0.273	0.447	0.677	0.859	0.809	0.101
1: 6400	0.202	0.293	0.438	0.537	0.545	0.090
1: 12800	0.146	0.194	0.281	0.350	0.363	0.088
1: 25600	0.112	0.140	0.191	0.229	0.231	0.081
1: 51200	0.100	0.122	0.139	0.173	0.174	0.089
1: 102400	0.093	0.104	0.116	0.130	0.134	0.084
1: 204800	0.091	0.100	0.104	0.117	0.113	0.087
Coating buffer	0.111	0.105	0.107	0.103	0.102	0.105

หมายเหตุ: ^{1/} ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ วัดที่เวลา 60 นาที หลังจากเติม substrate

^{2/} ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่มากกว่า normal serum 2 เท่า ให้ผลเป็นบวก



ภาพที่ 11 กราฟแสดงค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมต่อโปรตีนลูกผสม 6XHis-NSs (PAb-MYSV-NSs) จากการเจาะเลือด 5 ครั้ง (AS1-AS5) ใช้โปรตีน 6xHis-NSs ความเข้มข้น 3 $\mu\text{g/ml}$ เป็นแอนติเจนตรวจสอบด้วยเทคนิค DAC-ELISA วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm หลังจากเติม substrate นาน 60 นาที

8. ความจำเพาะของแอนติบอดีต่อโปรตีน NSs

8.1 ตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ผลิตได้กับเชื้อทอสโปไวรัส

8.1.1 ตรวจสอบด้วยเทคนิค DAC-ELISA

แอนติซีรั่มครั้งที่ 4 (PAb-MYSV-NSs4) ทำปฏิกิริยากับโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs และน้ำคั้นใบแตงร้านติดเชื้อ MYSV ที่ใช้เป็นแอนติเจนได้อย่างจำเพาะ แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นใบเมลอนติดเชื้อ MYSV น้ำคั้นใบโทงเทงติดเชื้อ WSMoV และ CaCV และน้ำคั้นใบยาสูบติดเชื้อ TNRV เมื่อเปรียบเทียบกับพืชปกติ (ภาพที่ 12) ส่วนแอนติซีรั่ม PAb-MYSV6-N ที่ใช้ตรวจสอบโปรตีน N ของเชื้อ MYSV ทำปฏิกิริยากับโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs น้ำคั้นใบเมลอนและใบแตงร้านติดเชื้อ MYSV น้ำคั้นใบโทงเทงติดเชื้อ WSMoV และ CaCV และน้ำคั้นใบยาสูบติดเชื้อ TNRV เมื่อเปรียบเทียบกับพืชปกติ (ภาพที่ 13)

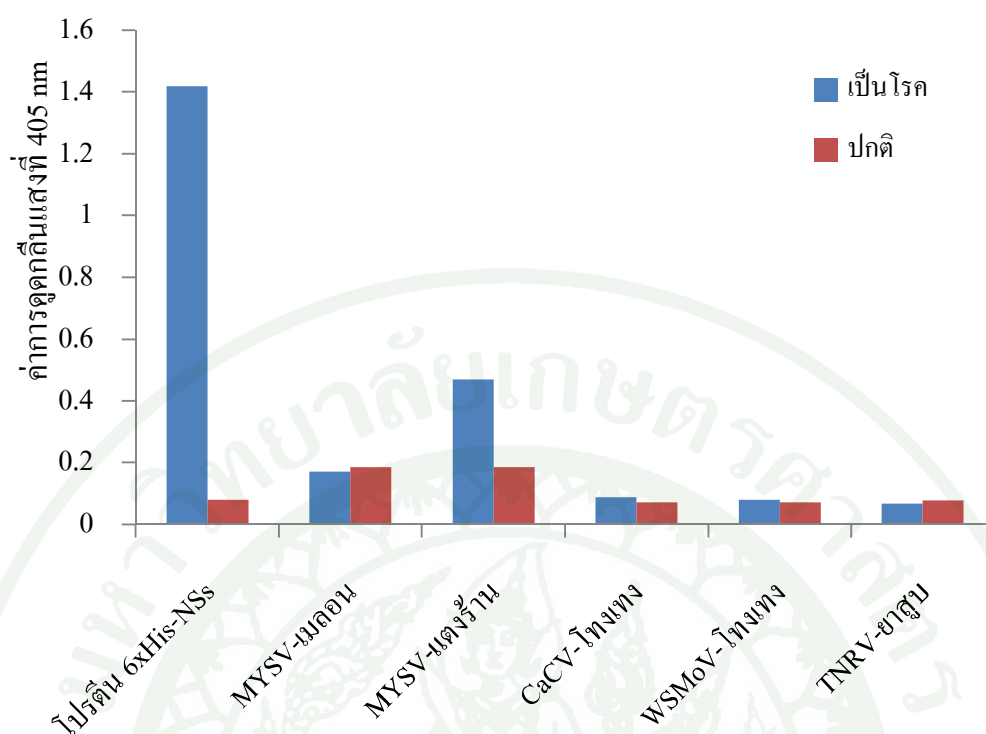
8.1.2 ตรวจสอบด้วยเทคนิค Dot immunobinding assay (DIBA)

ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค DIBA โดยดูจากการเกิดตะกอนสีม่วงขึ้นบริเวณที่หยดตัวอย่างน้ำคั้นใบพืชติดเชืบบนแผ่นเมมเบรน พบว่าแอนติซีรั่ม PAb-MYSV-NSs4 ทำปฏิกิริยากับโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs น้ำคั้นใบเมลอน และน้ำคั้นใบแตงร้านติดเชื้อ MYSV ได้อย่างจำเพาะ โดยไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นใบพืชติดเชื้อ CaCV, WSMoV และ TNRV (ตารางที่ 13, ภาพที่ 14ก) ส่วนแอนติซีรั่ม PAb-MYSV6-N ให้ผลสอดคล้องกับการตรวจสอบด้วยเทคนิค DAC-ELISA โดยทำปฏิกิริยากับโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs และน้ำคั้นใบพืชติดเชื้อ MYSV (แตงร้านและเมลอน), CaCV, WSMoV และ TNRV (ตารางที่ 13, ภาพที่ 14ข)

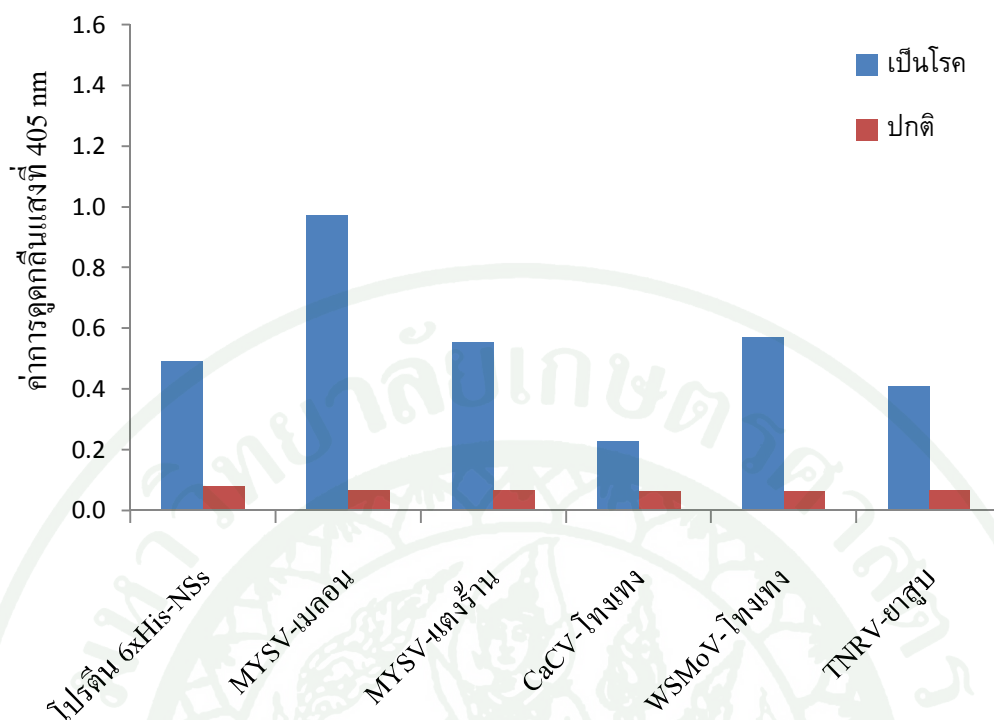
จากผลการตรวจสอบแสดงให้เห็นว่าแอนติซีรั่ม PAb-MYSV-NSs มีความจำเพาะในการตรวจสอบเชื้อ MYSV ในตัวอย่างพืชเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค DAC-ELISA (แตงร้าน) และเทคนิค DIBA (แตงร้านและเมลอน) โดยไม่เกิดปฏิกิริยากับตัวอย่างพืชติดเชื้อ WSMoV, CaCV และ TNRV ต่างจากแอนติซีรั่ม PAb-MYSV6-N ที่เกิดปฏิกิริยากับตัวอย่างพืชติดเชื้อ WSMoV, CaCV และ TNRV

แอนติซีรัม PAb-MYSV-NSs ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีน NSs ในน้ำคั้นใบเมลอน เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค DAC-ELISA ได้ ซึ่งอาจมีสาเหตุจากหลายปัจจัย คือ ในชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้ในการตรวจสอบมีการสะสมของโปรตีน NSs ไม่เท่ากัน ทั้งนี้ขึ้นกับระยะของการจำลองสารพันธุกรรมของไวรัส การกระจายตัวของไวรัสในเนื้อเยื่อพืช รวมถึงอายุของพืชอาศัยด้วย (Kormelink *et al.*, 1991; Sugiyama *et al.*, 2009) อีกทั้งโปรตีน NSs มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเกิด S-PTGS ของพืชจึงมีปริมาณมากในช่วงเริ่มต้นของการจำลองสารพันธุกรรมเพื่อเพิ่มปริมาณ แต่จะมีบทบาทน้อยลงในช่วงต่อมา จึงมีปริมาณน้อยลงตามไปด้วย ซึ่งส่งผลทำให้โปรตีน NSs ในเนื้อเยื่อพืชในช่วงเวลาต่างๆมีปริมาณไม่เท่ากัน (Takeda *et al.*, 2002) หรืออาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน NSs จากการใช้บัฟเฟอร์ในการבודตัวอย่างที่ไม่เหมาะสม หรือตัวอย่างที่ใช้ทดสอบเป็นตัวอย่างที่ถูกเก็บรักษาเป็นเวลานาน วิธีการเก็บรักษาตัวอย่างที่ไม่เหมาะสมส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ epitope ซึ่งมีความสำคัญอย่างมากต่อการจับของแอนติบอดี (Chen *et al.*, 2006) โดยพบว่า polyclonal antibody ที่ผลิตจาก recombinant protein อาจไม่สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบโปรตีนในสภาพธรรมชาติได้ เนื่องจากโปรตีนที่ได้จากการสังเคราะห์ในสภาพหลอดทดลองที่ใช้เป็นแอนติเจน มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ epitope ซึ่งส่งผลทำให้แอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถจดจำและทำปฏิกิริยากับโปรตีนในตัวอย่างพืชติดเชื้อ (native protein) ได้น้อยลง (Minafra *et al.*, 2000)

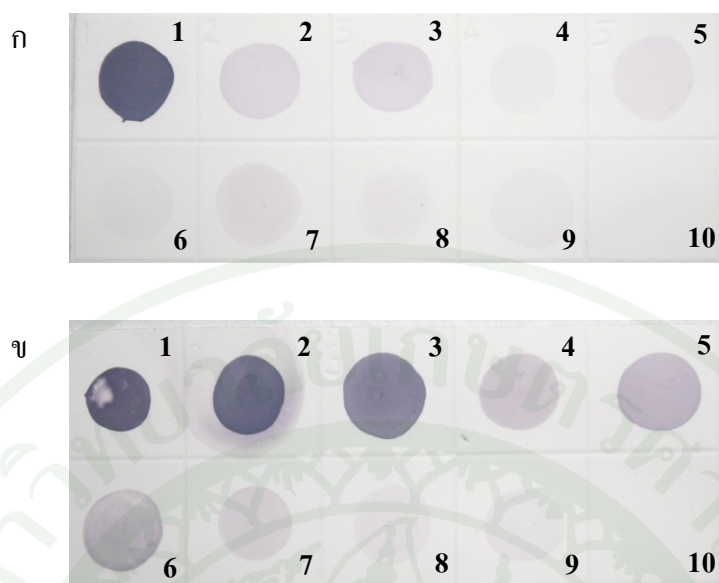
เมื่อเปรียบเทียบผลของการเกิดปฏิกิริยาพบว่า PAb-MYSV-NSs ทำปฏิกิริยาได้ดีที่สุดกับโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs สอดคล้องกันในการตรวจสอบทั้ง 2 เทคนิค (DAC-ELISA และ DIBA) แสดงว่า PAb-MYSV-NSs มีความจำเพาะอย่างสูงกับโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs และโปรตีนมีปริมาณมากทำให้สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกว่าในน้ำคั้นใบเมลอนและแตงร้านติดเชื้อ MYSV และพบว่า PAb-MYSV6-N สามารถทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นใบเมลอนและแตงร้านติดเชื้อ MYSV ได้ดีกว่า PAb-MYSV-NSs



ภาพที่ 12 ผลการทำปฏิกิริยาของแอนติซีรัมต่อโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs ของเชื้อ MYSV-SUT จากการเจาะเลือดครั้งที่ 4 (PAb-MYSV-NSs4) ที่เจือจาง 1:500 เท่า กับโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs และน้ำคั้นใบพืชเป็นโรค ด้วยเทคนิค DAC-ELISA วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm หลังจากเติม substrate นาน 60 นาที



ภาพที่ 13 ผลการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีต่อโปรตีน N ของเชื้อ Melon yellow spot virus (PAb-MYSV6-N) ที่เจือจาง 1:1,000 เท่ากับโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs และน้ำคั้นใบพืชเป็นโรค ด้วยเทคนิค DAC-ELISA วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm หลังจากเติม substrate นาน 60 นาที



ภาพที่ 14 ตะกอนสีม่วงบนแผ่น nitrocellulose membrane แสดงผลของปฏิกิริยาจำเพาะของ แอนติซีรั่มกับตัวอย่างโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs และน้ำคั้นใบพืชเป็นโรค วิเคราะห์ ด้วยวิธี Dot immunobinding assay (DIBA)

- (ก) แอนติซีรั่มต่อโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs ของเชื้อ MYSV-SUT จากการเจาะเลือก ครั้งที่ 4 (PAb-MYSV-NSs4) ที่เจือจาง 1:500 เท่า
- (ข) แอนติซีรั่มต่อโปรตีน N ของเชื้อ Melon yellow spot virus (PAb-MYSV6-N) ที่เจือจาง 1:1,000 เท่า

- | | |
|------------|-------------------------------|
| ช่องที่ 1 | โปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs-MYSV |
| ช่องที่ 2 | น้ำคั้นใบเมลอนติดเชื้อ MYSV |
| ช่องที่ 3 | น้ำคั้นใบแตงร้านติดเชื้อ MYSV |
| ช่องที่ 4 | น้ำคั้นใบโทงเทงติดเชื้อ CaCV |
| ช่องที่ 5 | น้ำคั้นใบโทงเทงติดเชื้อ WSMoV |
| ช่องที่ 6 | น้ำคั้นใบยาสูบติดเชื้อ TNRV |
| ช่องที่ 7 | น้ำคั้นใบแตงร้านปกติ |
| ช่องที่ 8 | น้ำคั้นใบโทงเทงปกติ |
| ช่องที่ 9 | น้ำคั้นใบยาสูบปกติ |
| ช่องที่ 10 | Extraction buffer (1X PBS) |

ตารางที่ 9 ผลของปฏิกิริยาจำเพาะของแอนติซีรัมต่อโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs ของเชื้อ MYSV-SUT จากการเจาะเลือดครั้งที่ 4 (PAb-MYSV-NSs4) ที่เจือจาง 1:500 เท่า และแอนติซีรัมต่อโปรตีน N ของเชื้อ Melon yellow spot virus (PAb-MYSV6-N) ที่เจือจาง 1:1,000 เท่า กับตัวอย่างโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs และน้ำคั้นใบพืชเป็นโรคบนแผ่น nitrocellulose membrane วิเคราะห์ด้วยวิธี Dot immunobinding assay (DIBA)

ตัวอย่างพืช	ผลการตรวจวินิจฉัยด้วยแอนติซีรัม ^{1/}	
	PAb-MYSV-NSs4	PAb-MYSV-N
6xHis-NSs protein	+	+
1X PBS Extraction buffer	-	-
<i>Cucumis melo</i> -MYSV	+	+
<i>Cucumis sativus</i> -MYSV	+	+
<i>Cucumis sativus</i> -ปกติ	-	-
<i>Physalis angulata</i> -CaCV	-	+
<i>Physalis angulata</i> -WSMoV	-	+
<i>Physalis angulata</i> -ปกติ	-	-
<i>Nicotiana glutinosa</i> -TNRV	-	+
<i>Nicotiana glutinosa</i> -ปกติ	-	-

^{1/} + เกิดปฏิกิริยา

- ไม่เกิดปฏิกิริยา

อย่างไรก็ตามพบว่าแอนติซีรัม PAb-MYSV6-N สามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs ในการตรวจสอบด้วยเทคนิค DAC-ELISA และ DIBA ได้ ทั้งนี้เนื่องจาก PAb-MYSV6-N สามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนขนาดเล็กที่ปนเปื้อนมากับโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน Ni-NTA column

8.2 ตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ผลิตได้กับเชื้อทอสปอไวรัสและเชื้อไวรัสชนิดอื่นที่เข้าทำลายพืชวงศ์แตง

แอนติซีรัม PAb-MYSV-NSs4 ทำปฏิกิริยากับโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs และน้ำคั้นใบแตงร้านติดเชื้อ MYSV แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นใบเมลอนติดเชื้อ MYSV และน้ำคั้นใบพืชติดเชื้อ WSMoV, CaCV, TNRV, CMV และ PRSV (ภาพที่ 15)

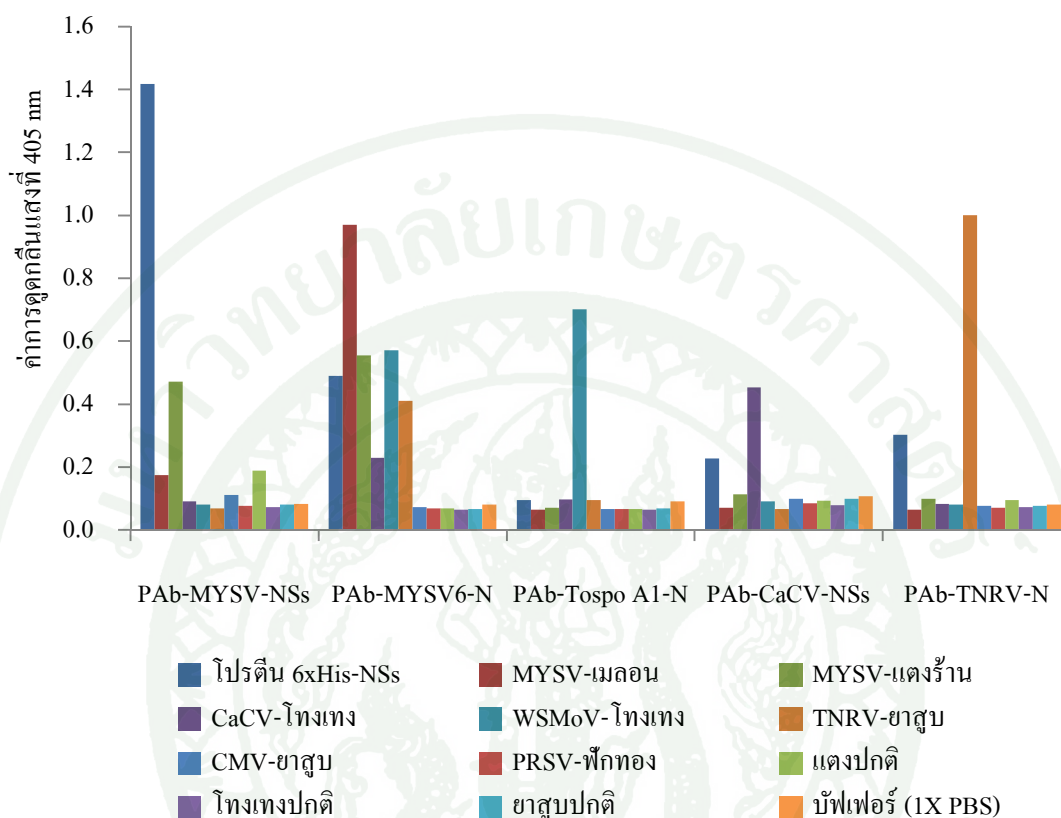
แอนติซีรัม PAb-MYSV6-N ทำปฏิกิริยากับโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs และน้ำคั้นใบพืชติดเชื้อ MYSV (แตงร้านและเมลอน), WSMoV, CaCV, และ TNRV แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นใบพืชติดเชื้อ CMV และ PRSV (ภาพที่ 15)

แอนติซีรัม PAb-CaCV-NSs และ PAb-TNRV-N ทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับน้ำคั้นใบโทงเทงติดเชื้อ CaCV และน้ำคั้นใบยาสูบติดเชื้อ TNRV ตามลำดับ โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับน้ำคั้นใบพืชติดเชื้อ MYSV, WSMoV, TNRV, CMV และ PRSV และสามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs เล็กน้อย ส่วนแอนติซีรัม PAb-Tospo A1-N ทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นใบโทงเทงติดเชื้อ WSMoV เท่านั้น

จากผลการตรวจวินิจฉัย แสดงให้เห็นว่าแอนติซีรัม PAb-MYSV-NSs, PAb-CaCV-NSs และ PAb-TNRV-N มีความจำเพาะในการตรวจสอบเชื้อไวรัสในน้ำคั้นพืชติดเชื้อที่ใช้ทดสอบ โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อในกลุ่มทอสปอไวรัสและเชื้อไวรัสชนิดอื่นที่เข้าทำลายพืชวงศ์แตง แตกต่างจาก PAb-MYSV6-N และ PAb-Tospo A1-N อย่างไรก็ตามพบว่าแอนติซีรัม PAb-MYSV-NSs เกิดปฏิกิริยาข้ามกับน้ำคั้นใบแตงร้านปกติเล็กน้อย ดังนั้นในการตรวจสอบครั้งต่อไปจึงควรทำการ cross absorption ด้วยน้ำคั้นใบแตงร้านปกติก่อนเพื่อลดปฏิกิริยาข้ามที่เกิดขึ้น

จากการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าแอนติซีรัม PAb-MYSV-NSs มีความจำเพาะในการตรวจสอบโปรตีน NSs ในพืชติดเชื้อ MYSV มากกว่าแอนติซีรัม PAb-MYSV6-N จึงสามารถนำมา

ใช้ประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยเพื่อแยกเชื้อ MYSV ออกจากเชื้อ WSMoV, CaCV และ TNRV ในพืชได้



ภาพที่ 15 ผลการทำปฏิกิริยาของแอนติซีรัมต่อโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs และน้ำคั้นใบพืชเป็นโรค ด้วยเทคนิค DAC-ELISA วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm หลังจากเติม substrate นาน 60 นาที

PAb-MYSV-NSs	แอนติซีรัมต่อโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs-MYSV
PAb-MYSV6-N	แอนติซีรัมต่อโปรตีน N ของเชื้อ MYSV
PAb-Tospo A1-N	แอนติซีรัมต่อโปรตีน N ของเชื้อทอสปอไวรัสซีโรครูป IV
PAb-CaCV-NSs	แอนติซีรัมต่อโปรตีน NSs ของเชื้อ CaCV
PAb-TNRV-N	แอนติซีรัมต่อโปรตีน N ของเชื้อ TNRV

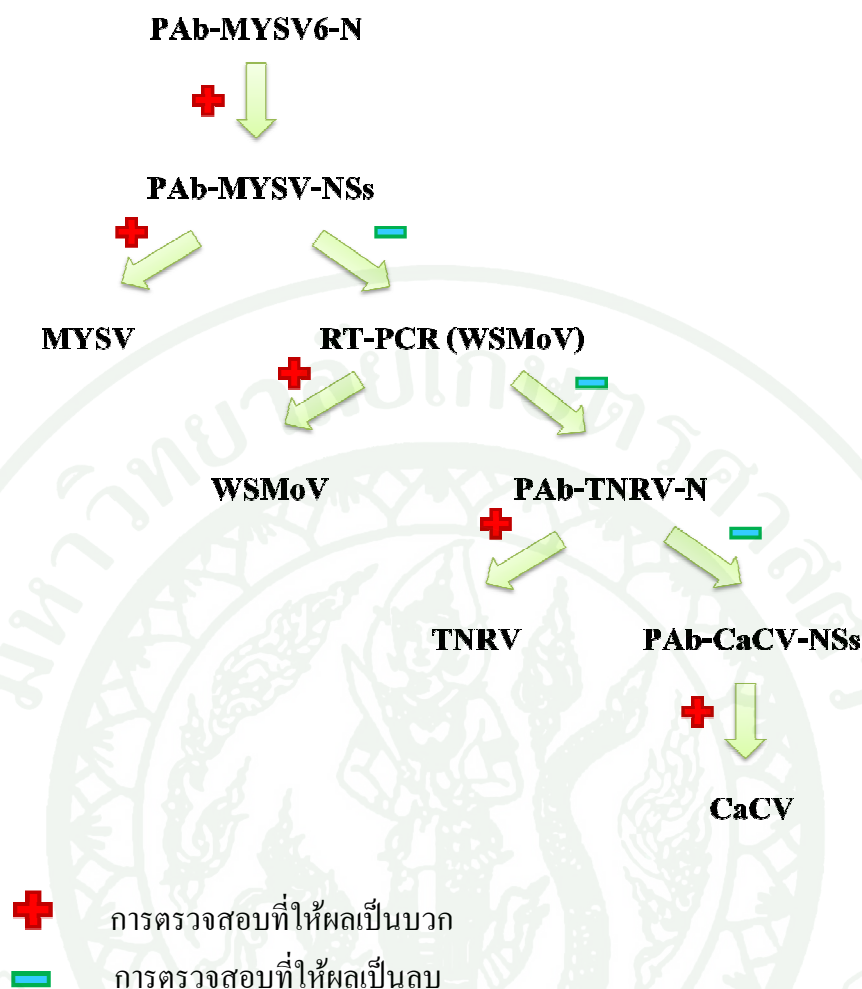
8. แนวทางการวินิจฉัยโรคพืชที่เกิดจากเชื้อทอสปอไวรัส

จากผลการทดลองสามารถสรุปขั้นตอนการเลือกใช้แอนติซีรัมในการตรวจวินิจฉัยเชื้อทอสปอไวรัส 4 ชนิด ที่พบในประเทศไทย ได้แก่ เชื้อ MYSV, CaCV, WSMoV และ TNRV ด้วยเทคนิค DAC-ELISA (กรณีตัวอย่างที่ไม่ใช่เมลอน) และ DIBA โดยใช้แอนติซีรัม PAb-MYSV6-N (เกิดปฏิกิริยากับเชื้อ MYSV, CaCV, WSMoV และ TNRV) PAb-MYSV-NSs (จำเพาะกับเชื้อ MYSV) PAb-CaCV-NSs (จำเพาะกับเชื้อ CaCV) และ PAb-TNRV-N (จำเพาะกับเชื้อ TNRV) ร่วมกับเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเชื้อ WSMoV ดังนี้

ตัวอย่างพืชที่นำมาตรวจสอบแสดงอาการคล้ายถูกเชื้อทอสปอไวรัสเข้าทำลาย คือ ใบด่างเหลือง ใบด่างเขียวอ่อนสลับเขียวเข้ม ใบบิดเบี้ยว ต้นแคระแกร็น มีแผลเนื้อเยื่อตาย แผลจุดไหม้ จุดเหลือง ขอบใบไหม้ ยอดไหม้ ดอกค่าง ผลสีไม่สม่ำเสมอ ผลกระแกร็น เป็นต้น ตรวจสอบตัวอย่างพืชเบื้องต้นว่าตัวอย่างพืชติดเชื้อทอสปอไวรัส 4 ชนิด นี้หรือไม่ด้วยแอนติซีรัม PAb-MYSV6-N หากให้ผลเป็นบวกจึงทำการวินิจฉัยเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อต่อไป โดยแบ่งตัวอย่างพืชออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มของพืชวงศ์แตงและพืชที่ไม่ใช่วงศ์แตง สำหรับพืชวงศ์แตงซึ่งเป็นพืชอาศัยหลักของเชื้อ MYSV และ WSMoV จึงควรใช้ PAb-MYSV-NSs ในการตรวจสอบก่อนเป็นลำดับแรก ทั้งนี้เนื่องจากพืชวงศ์แตงมีโอกาสสูงที่จะถูกเชื้อ MYSV และ WSMoV เข้าทำลาย แต่เนื่องจาก PAb-MYSV-NSs มีความจำเพาะอย่างสูงในการตรวจสอบเชื้อ MYSV ส่วนเชื้อ WSMoV ไม่มีแอนติซีรัมที่จำเพาะ หากผลการตรวจสอบเป็นบวกแสดงว่าตัวอย่างพืชนั้นติดเชื้อ MYSV ถ้าเป็นลบให้ตรวจสอบต่อด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับเชื้อ WSMoV หากปฏิกิริยา RT-PCR ให้ผลที่แปลว่าไม่ใช่เชื้อ WSMoV ให้ตรวจสอบต่อด้วย PAb-TNRV-N ซึ่งมีความจำเพาะอย่างสูงในการตรวจสอบเชื้อ TNRV เนื่องจากเชื้อ TNRV เป็นเชื้อทอสปอไวรัสชนิดใหม่ที่พบว่าการแพร่ระบาดเพิ่มมากขึ้น และมีพืชอาศัยหลากหลายกว่าเชื้อ CaCV เช่น พริก, มะเขือเทศ, ลำโพง, ถั่วพุ่ม, ถั่วลิสง, ลำโพง, โทงเทง, ยาสูบ และคีนโโปเดียม (Chiemsombat *et al.*, 2010; Seepiban *et al.*, 2011) หากผลการตรวจสอบเป็นบวกแสดงว่าตัวอย่างพืชนั้นติดเชื้อ TNRV ถ้าเป็นลบให้ตรวจสอบต่อไปด้วย PAb-CaCV-NSs ซึ่งมีความจำเพาะอย่างสูงในการตรวจสอบเชื้อ CaCV หากผลการตรวจสอบเป็นบวกแสดงว่าตัวอย่างพืชนั้นติดเชื้อ CaCV (ภาพที่ 16)

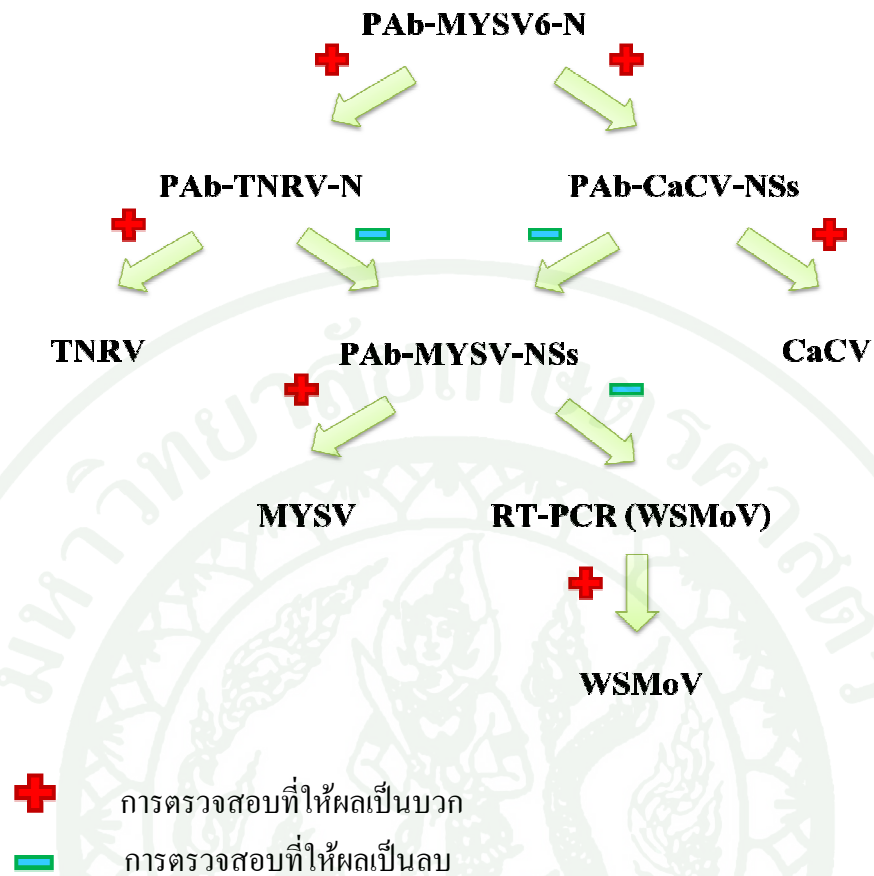
สำหรับพืชที่ไม่ใช่วงศ์แตงเมื่อตรวจสอบเบื้องต้นด้วยแอนติซีรัม PAb-MYSV6-N แล้ว ถ้าผลเป็นลบให้ตรวจสอบต่อด้วย PAb-TNRV-N ก่อนเป็นลำดับแรก เนื่องจากมีพืชอาศัยหลากหลายกว่าเชื้ออื่นๆ และมีความจำเพาะอย่างสูงในการตรวจสอบเชื้อ TNRV หากผลการตรวจสอบเป็น

บอกแสดงว่าตัวอย่างพืชนั้นติดเชื้อ TNRV ถ้าเป็นลบให้ตรวจสอบต่อไปด้วย PAb-CaCV-NSs หรือ อาจตรวจสอบด้วย PAb-TNRV-N และ PAb-CaCV-NSs พร้อมกัน เนื่องจากเชื้อ TNRV และ CaCV มีพืชอาศัยร่วมกันอยู่ เช่น ถั่วลิสง พริก และมะเขือเทศ เป็นต้น (Chiemsombat *et al.*, 2010; Seepiban *et al.*, 2011) หากผลการตรวจสอบเป็นบวกแสดงว่าตัวอย่างพืชนั้นติดเชื้อ TNRV หรือ CaCV ในกรณีที่ให้ผลเป็นบวกทั้ง 2 ซ้ำกัน แสดงว่าพืชนั้นถูกเชื้อเข้าทำลายร่วมกัน ถ้าเป็นลบให้ ตรวจสอบต่อไปด้วย PAb-MYSV-NSs เนื่องจากพืชที่ไม่ใช่วงศ์แตงไม่ใช่พืชอาศัยหลักของเชื้อ MYSV และ WSMoV จึงมีโอกาสถูกเชื้อ MYSV และ WSMoV เข้าทำลายน้อยกว่าเชื้อ TNRV และ CaCV หากผลการตรวจสอบเป็นบวกแสดงว่าตัวอย่างพืชนั้นติดเชื้อ MYSV ถ้าเป็นลบให้ตรวจสอบ ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับเชื้อ WSMoV (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 16 แผนผังขั้นตอนการตรวจวินิจฉัยเพื่อจำแนกเชื้อทอสโปไวรัส 4 ชนิด ที่พบในประเทศไทยในพืชวงศ์แตงด้วยเทคนิค DAC-ELISA และ DIBA

PAb-MYSV-NSs	แอนติซีรัมต่อโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs-MYSV
PAb-MYSV6-N	แอนติซีรัมต่อโปรตีน N ของเชื้อ MYSV
PAb-Tospo A1-N	แอนติซีรัมต่อโปรตีน N ของเชื้อทอสโปไวรัสซีโรกรุ๊ป IV
PAb-CaCV-NSs	แอนติซีรัมต่อโปรตีน NSs ของเชื้อ CaCV
PAb-TNRV-N	แอนติซีรัมต่อโปรตีน N ของเชื้อ TNRV



ภาพที่ 17 แผนผังขั้นตอนการตรวจวินิจฉัยเพื่อจำแนกเชื้อทอสโปไวรัส 4 ชนิด ที่พบในประเทศไทยในพืชที่ไม่ใช่วงศ์แตงด้วยเทคนิค DAC-ELISA และ DIBA

PAb-MYSV-NSs	แอนติซีรั่มต่อโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs-MYSV
PAb-MYSV6-N	แอนติซีรั่มต่อโปรตีน N ของเชื้อ MYSV
PAb-Tospo A1-N	แอนติซีรั่มต่อโปรตีน N ของเชื้อทอสโปไวรัสซีโรกรูป IV
PAb-CaCV-NSs	แอนติซีรั่มต่อโปรตีน NSs ของเชื้อ CaCV
PAb-TNRV-N	แอนติซีรั่มต่อโปรตีน N ของเชื้อ TNRV

สรุป

ตัวอย่างใบพืชที่เก็บจากแปลงปลูกในจังหวัดนครปฐม นครราชสีมา และเพชรบุรี 5 ชนิด คือ แตงกวา 175 ตัวอย่าง แตงร้าน 139 ตัวอย่าง แตงโม 1 ตัวอย่าง โทงเทง 1 ตัวอย่าง และพริก 5 ตัวอย่าง พบว่าแตงกวา 3 ตัวอย่าง และพริก 3 ตัวอย่าง ติดเชื้อทอสปोไวรัส (WSMoV, CaCV หรือ TNRV) แต่ไม่ติดเชื้อ MYSV แตงร้าน 59 ตัวอย่าง ติดเชื้อ MYSV แต่ไม่ติดเชื้อทอสปอไวรัสชนิดอื่น (WSMoV, CaCV หรือ TNRV) แตงกวา 31 ตัวอย่าง และแตงร้าน 21 ตัวอย่าง ถูกเชื้อ MYSV เข้าทำลายร่วมกับเชื้อทอสปอไวรัสชนิดอื่น (WSMoV, CaCV หรือ TNRV)

ตัวอย่างใบเมลอนจากโรงเรือนในจังหวัดนครราชสีมา 15 ตัวอย่าง พบว่ามี 13 ตัวอย่าง ติดเชื้อ MYSV ให้ชื่อไอโซเลทว่า SUT

ตัวอย่างใบแตงร้านและใบเมลอนจากบริษัท โกลส (ประเทศไทย) จำกัด จังหวัดกาญจนบุรี ชนิดละ 7 ตัวอย่าง พบว่าเมลอน 1 ตัวอย่าง ติดเชื้อ MYSV แต่ไม่ติดเชื้อทอสปอไวรัสชนิดอื่น (WSMoV, CaCV หรือ TNRV) และเมลอน 6 ตัวอย่าง ถูกเชื้อ MYSV เข้าทำลายร่วมกับเชื้อทอสปอไวรัสชนิดอื่น (WSMoV, CaCV หรือ TNRV)

ยีน N ของเชื้อ MYSV ไอโซเลท SUT ซึ่งมีขนาด 840 นิวคลีโอไทด์ แปรหัสได้โปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 280 เรซิดิวส์ น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 31.159 กิโลดาลตัน มีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนกับเชื้อ MYSV ไอโซเลทอื่นๆที่ระดับ 96.6-99.2 และ 98.9-100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับไอโซเลท Tospo-melo ที่พบในประเทศญี่ปุ่น W3-Kalasin และ Ph122 ที่พบในประเทศไทย มากที่สุด และมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนกับเชื้อ WSMoV, CaCV และ TNRV ที่ระดับ 56.2-62.1 และ 50.9-57.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ยีน NSs ของเชื้อ MYSV ไอโซเลท SUT ซึ่งมีขนาด 1,410 นิวคลีโอไทด์ แปรหัสได้โปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 470 เรซิดิวส์ น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 53.169 กิโลดาลตัน มีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนกับเชื้อ MYSV ไอโซเลทอื่นๆที่ระดับ 95.4-97.8 และ 95.5-97.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับไอโซเลท TW มากที่สุด มีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนกับเชื้อ WSMoV, CaCV และ TNRV ที่ระดับ 51.6-56.1 และ 42.3-48.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วย Phylogenetic tree โดยใช้การวิเคราะห์แบบ UPGMA พบว่าลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NSs สามารถใช้ในการจำแนกเชื้อ MYSV ออกจากเชื้อทอสโพไวรัสชนิดอื่นได้เช่นเดียวกับโปรตีน N แต่สามารถจำแนกเชื้อ MYSV ไอโซเลต SUT แยกออกจากเชื้อ MYSV ไอโซเลตที่พบในประเทศญี่ปุ่นและไต้หวันได้ดีกว่าโปรตีน N

โปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs ของเชื้อ MYSV-SUT ที่สังเคราะห์ได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 54.764 กิโลดาลตัน ความเข้มข้น 1.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้เป็นแอนติเจนต่อแอนติซีรัม PAb-MYSV-NSs ซึ่งมีค่าไตเตอร์อยู่ในช่วง 800-3,200 และแอนติซีรัมจากการเจาะเลือดครั้งที่ 4 ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับแอนติซีรัมทั้ง 5 ครั้ง ที่ค่าความเจือจาง 1: 3,200

แอนติซีรัม PAb-MYSV-NSs ที่ผลิตได้มีความจำเพาะอย่างสูงในการตรวจสอบน้ำคั้นใบพืชที่ติดเชื้อ MYSV เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค DAC-ELISA (ແຕງຮ້ານ) และ Dot immunobinding assay (ແຕງຮ້ານແລະເມລອນ) โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีน NSs ในน้ำคั้นใบพืชที่ติดเชื้อ WSMoV, CaCV และ TNRV

แอนติซีรัม PAb-MYSV-NSs และ PAb-MYSV6-N ไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นใบพืชที่ติดเชื้อ CMV และ PRSV แอนติซีรัม PAb-CaCV-NSs และ PAb-TNRV-N ทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับน้ำคั้นใบพืชที่ติดเชื้อ CaCV และ TNRV ตามลำดับ เท่านั้น โดยไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นใบพืชที่ติดเชื้อชนิดอื่น และแอนติซีรัม PAb-Tospo A1-N ทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นใบพืชที่ติดเชื้อ WSMoV เท่านั้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

คณิงนิจ ศรีวิสัย. 2553. เชื้อ **Tomato necrotic ringspot virus** ที่แยกจากพริก (*Capsicum annuum*) ในภาคเหนือของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 102 น.

สุภาวณี ปานสะอาด. 2550. การตรวจสอบทางอิมมูโนวิทยาโดยใช้โพลีคลอนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกแบบลูกผสมของเชื้อทอสปอไวรัส. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. 127 น.

สุรศักดิ์ ขันคำ. 2550. การโคลนยีนและสังเคราะห์โปรตีน NSs ของเชื้อ **Capsicum chlorosis virus** สาเหตุโรคยอดไหม้ของถั่วลิสงในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 88 น.

สุรศักดิ์ ขันคำ, พิศสุวรรณ เจียมสมบัติ, รัชนี สงประยูร และทิพย์วดี อรรถธรรม. 2550. ลักษณะอาการสัณฐานวิทยาและยีนโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกของเชื้อ **Capsicum chlorosis virus** สาเหตุโรคยอดไหม้ของถั่วลิสง. ว.วิทย.เกษตร. 38 (6): 493-503.

อรประไพ คชนันทน, ชาญณรงค์ ศรีภิบาล, สุภาวณี ปานสะอาด, อัญญา บุญชด, นุชนาถ วารินทร์, อรพรรณ หิมาวันโต, พิศสุวรรณ เจียมสมบัติ, ปรียพรรณ พงศาพิชณ์ และรัชนี สงประยูร. 2549. การผลิตแอนติบอดีเพื่อตรวจเชื้อทอสปอไวรัสที่พบในประเทศไทย. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 44 (สาขาพืช). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

Adam, G., P. Roggero, F. Malavasi, R.G. Milne and G. Papa. 1995. Approach to a general tospovirus assay using antibodies to purified tomato spotted wilt tospovirus G protein. **EPPO Bull** 25: 247-257.

- Akram, M., R.K. Jain, V. Chaudhary, Y.S. Ahlawat and S.M. Paul Khurana. 2004. Comparison of Groundnut bud necrosis virus isolates based on movement protein (NSm) gene sequence. **Ann. appl. Biol.** 145: 285-289.
- Bag, S., K.L. Druffel and H.R. Pappu. 2010. Structure and genome organization of the large RNA of iris yellow spot virus (genus *Tospovirus*, family *Bunyaviridae*). **Arch Virol** 155: 275–279.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 12: 248-254.
- Chang, S., J. Puryear and J. Cairney. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine. **Plant Mol. Biol. Rep.** 11: 113-116.
- Chao, C.H., T.C. Chen, Y.C. Kang, J.T. Li, L.H. Huang and S.D. Yeh. 2010. Characterization of Melon yellow spot virus infecting cucumber (*Cucumis sativus* L.) in Taiwan. **Plant Pathology Bulletin** 19: 41-52.
- Chen, T.C., C.W. Huang, Y.W. Kuo, F.L. Liu, C.H. H. Yuan, H.T. Hsu, and S.D. Yeh. 2006. Identification of common epitopes on a conserved region of NSs proteins among tospoviruses of Watermelon silver mottle virus serogroup. **Phytopathology** 96: 1296-1304.
- _____, Y.Y. Lu, Y.H. Cheng, C.A. Chang and S.D. Yeh. 2008. Melon yellow spot virus in watermelon: a first record from Taiwan. **Plant Pathol** 57: 765.
- _____, _____, _____, J.T. Li, Y.C. Yeh, Y.C. Kang, C.P. Chang, L.H. Huang, J.C. Peng and S.D. Yeh. 2010. Serological relationship between Melon yellow spot virus and Watermelon silver mottle virus and differential detection of the two viruses in cucurbits. **Arch Virol** 155: 1085–1095.

- Chiemsombat, P., O. Gajanandana, N. Warin, R. Honprayoon, A. Bhunchoth and P. Pongsapich. 2008. Biological and molecular characterization of tospoviruses in Thailand. **Arch. Virol.** 153(3): 571-7.
- _____, M. Sharman, K. Srivilai, P. Campbell, D. Persley and S. Attathom. 2010. A new tospovirus species infecting *Solanum esculentum* and *Capsicum annuum* in Thailand. **Australasian Plant Disease Notes** 5: 75-78.
- Chu, F.H., C.H. Chao, M.H. Chung, C.C. Chen and S.D. Yeh. 2001. Completion of the genome sequence of Watermelon silver mottle virus and utilization of degenerate primers for detecting tospoviruses in five serogroups. **Phytopathology** 91: 361-368.
- David, R.J. 2005. Plant viruses transmitted by thrips. **Eur. J. Plant Pathol** 113: 199-157.
- De Haan, P., R. Kormelink, R. de O. Resende, F. Van Poewijk, D. Peters and R. Goldbach. 1991. Tomato spotted wilt virus L RNA encodes a putative RNA polymerase. **J Gen Virol** 71: 2207-2216.
- De Haan, P., L. Wagemakers, D. Peters and R. Goldbach. 1990. The S RNA segment of tomato spotted wilt virus has an ambisense character. **J Gen Virol** 71: 1001-1007.
- Fauquet, C.M., M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger and L.A. Ball. 2005. **Virus taxonomy, 8th** report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic, New York, p. 1162.
- Feldhoff, A., M. Kikkert, R. Kormelink, G. Krczal, R. Goldbach and D. Peters. 1997. Serological comparison of tospoviruses with polyclonal antibodies produced against the structural proteins of tomato spotted wilt virus. **Arch Virol** 142: 781-793.

- Gajanandana, O., C. Seepiban, S. Pansa-ard, A. Bhunchot, N. Warin, O. Himananto, P. Pongsapich, P. Chiemsombat and R. Hongprayoon. 2006. Production of antibodies for detection of tospoviruses in Thailand. **Proceedings of 44th Kasetsart university Annual Conference**, 30 January-2 February Kasetsart University, Bangkok, pp 556-563 (Abstract In English).
- German, T.L., D.E. Ullman and J.W. Moyer. 1992. Tospoviruses: diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships. **Annu. Rev. Phytopathol.** 30: 315-348.
- Hanssani-Mehraban, A., J. Saaijer, D. Peters, R. Goldbach and R. Kormelink. 2005. A new tomato-infecting tospovirus from Iran. **Phytopathology** 95: 852-858.
- Heinze, C., E. Maiss, G. Adam and R. Casper. 1995. The complete nucleotide sequence of the S RNA of a new Tospovirus species, representing serogroup IV. **Phytopathol** 85: 683-690.
- _____, P. Roggero, M. Sohn, A.M. Vaira, V. Masenga and G. Adam. 2000. Peptide-derived broad-reacting antisera against tospovirus NSs protein. **Journal of Virological Methods** 89: 137-146.
- Jain, R.K., N. A. Pandey, M. Krishnareddy and B. Mandal. 2005. Immunodiagnosis of groundnut and watermelon bud necrosis viruses using polyclonal antiserum to recombinant nucleocapsid protein of Groundnut bud necrosis virus. **J. Virol. Methods** 130: 162-164.
- Jones, R.D. 2005. Plant viruses transmitted by thrips. **Eur J Plant Pathol.** 113: 119-157.
- Kato, K., K. Hanada and M. Kameya-Iwaki. 1999. Transmission mode host range and electron microscopy of a pathogen causing a new disease of melon (*Cucumis melo*) in Japan. **Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.** 65: 624-627.

- _____, _____ and _____. 2000. Melon yellow spot virus: a distinct species of the genus Tospovirus isolated from melon. **Phytopathology** 90: 422–426.
- Knierim, D., R. Blawid and E. Maiss. 2006. The complete nucleotide sequence of a capsicum chlorosis virus isolate from *Lycopersicon lycopersicum* in Thailand. **Arch Virol** 151: 1761-1782.
- Kormelink, R., M. Storms, J. van Lent, D. Peters and R. Goldbach. 1994. Expression and subcellular location of the NS (M) protein of tomato spotted wilt virus (TSWV), a putative viral movement protein. **Virology** 200: 56-65.
- _____, P. de Haan, C. Meurs, C. Peters and R. Goldbach. 1992. The nucleotide sequence of the M RNA segment of tomato spotted wilt virus, a bunyavirus with two ambisense RNA segments. **J Gen Virol** 73: 2795-2804.
- _____, E.W. Kitajima, P. de Haan, D. Zuidema, D. Peters and R. Goldbach. 1991. The nonstructural protein (NSs) encoded by ambisense S RNA segment of tomato spotted wilt virus is associated with fibrous structures in infected plant cells. **Virology** 181: 459-468.
- Lawson, R.H., M.M. Dienelt and H.T. Hsu. 1996. Ultrastructural comparison of defective, partially defective and nondefective isolates of impatiens necrosis spot virus. **Phytopathology** 86: 650-661.
- Minafra, A., P. Casati, V. Elicio, A. Rowhani, P. Saldarelli, V. Savino and G.P. Martelli. 2000. Serological detection of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV) by a polyclonal antiserum to recombinant virus coat protein. *Vitis* 39: 115-118.
- Moyer, J.W. 1999. Tospoviruses (Bunyaviridae). pp. 1803–1807. In: **Granoff, A., R.G. Webster (eds.)**. Encyclopedia of Virology. Academic, San Diego, CA.

Okuda, M., K. Kato, K. Hanada and T. Iwanami. 2004. Complete nucleotide sequence of L RNA segment of Melon yellow spot virus. **Jpn J Phytopathol** 70: 14-17.

_____, _____, _____, and _____. 2006. Nucleotide sequence of melon yellow spot virus M RNA segment and characterization of non-viral sequences in subgenomic RNA. **Arch Virol** 151: 1-11.

_____, S. Taba and K. Hanada. 2003. The S RNA segment determines symptom differences on *Tetragonia expansa* between two Watermelon silver mottle virus isolates. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 62: 327-332.

_____, S. Takeuchi, S. Taba, K. Kato and K. Hanada. 2002. Melon yellow spot virus and watermelon silver mottle virus: outbreak of cucurbit infecting tospovirus in Japan. **Acta Horticult** 588: 143-148.

Pang, S.Z., J.L. Slightom and D. Gonsalves. 1993. The biological properties of a distinct tospovirus and sequence analysis of its S RNA. *Phytopathology* 83: 728-733.

Persley, D., M. Sharman, J. Thomas, I. Kay, S. Heisswolf and L. McMichael. 2007. Thrips and tospovirus, a management guide. **Cooperative research centre for tropical plant protection**. p. 18.

Prins, M. and R. Goldbach. 1998. The emerging problem of tospovirus infection and non conventional methods of control. **Trends in Microbiol** 6: 31-35.

Richmond, K.E., K. Chenault, J.L. Sherwood and T.L. German. 1998. Characterization of the nucleic acid binding properties of Tomato spotted wilt virus nucleocapsid protein. **Virol.** 248: 6-11.

Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis. 2001. **Molecular Cloning: A laboratory Manual**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp. 31-38, 116-118.

- Seepiban, C., O. Gajanandana, P. Chiemsombat, T. Attathom and S. Attathom. 2009. Characterization of tomato necrotic ringspot virus (TNRV), a new species isolated from Thailand. **ABIC 2009 (Agricultural Biotechnology International Conference)**. September 22-25, 2009. Bangkok, Thailand.
- _____, _____, T. Attathom and S. Attathom. 2011. Tomato necrotic ringspot virus, a new tospovirus isolated in Thailand. **Arch Virol** 156: 263–274.
- Sugiyama, M., Y. Yoshioka and Y. Sakata. 2009. Effect of temperature on symptom expression and viral spread of Melon yellow spot virus in resistant cucumber accessions. **J Gen Plant Pathol** 75: 381–387.
- Takeda, A., K. Sugiyama, H. Nagano, M. Mori and M. Kaido. 2002. Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of Tomato spotted wilt virus. **FEBS Lett** 532: 75–79.
- Takeuchi, S., Y. Shimomoto and K. Ishikawa. 2009. First report of Melon yellow spot virus infecting balsam pear (*Momordica charantia* L.) in Japan. **J Gen Plant Pathol** 75: 154–156.
- Ullman, D.E., T.L. German, J.L. Sherwood, D.M. Westcot and F.A. Cantone. 1993a. Tospovirus replication in insect vector cells : immunocytochemical evidence that the nonstructural protein encoded by the S RNA of tomato spotted wilt tospovirus is present in thrips vector cells. **Phytopathology** 83: 456-463.
- _____, J.L. Sherwood, T.L. German, D.M. Westcot, K.D. Chenault and F.A. Cantone. 1993b. Location and composition of cytoplasmic inclusions in thrips cell infected with tomato spotted wilt tospovirus (TSWV). **Phytopathology** 83: 1374 (Abstract).

- Van de Wetering, F., R. Goldbach and D. Peters. 1996. Tomato spotted wilt tospovirus ingestion by first larval instar of *Frankliniella occidentalis* is a prerequisite for transmission. **Phytopathology** 86: 900-905.
- Van Poelwijk, F., J. Kolkman and R. Goldbach. 1996. Sequence analysis of the 5' ends of tomato spotted wilt virus N mRNAs. **Arch Virol** 141: 177-184.
- Whitfield, A.E., D.E. Ullman and T.L. German. 2005. Tospovirus-thrips interaction. **Annu. Rev. Phytopathol.** 43: 459-489.
- Wiboonchotikorn, N., P. Chiemsombat and R. Hongprayoon. 2012. In Vitro expression of NSs protein of Melon yellow spot virus infecting melon in Thailand and serological activity of NSs antibody in virus diagnosis. **Australasian Plant Pathol.** (DOI) 10.1007/S13313-012-0124-8
- Yeh, S.D. and T.F. Chang. 1995. Nucleotide sequence of the N gene of watermelon silver mottle virus, a proposed new member of the genus Tospovirus. **Phytopathology** 85: 58-64.
- _____, I.J. Sun, H.M. Ho and T.F. Chang. 1996. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of the S RNA of watermelon silver mottle virus. **Acta Hort** 431: 244-260.
- Zheng, Y.X., C.C. Chen, C.J. Yang, S.D. Yeh and F.J. Jan. 2008. Identification and characterization of a tospovirus causing chlorotic ringspots on *Phalaenopsis* orchids. **Eur. J. Plant Pathol** 120: 199-209.



การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. LB broth

Thyptone	10	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
NaCl	5	กรัม

ซึ่งส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร และนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ถ้าเตรียม LB agar ให้เติม agar 15 กรัมต่อลิตร

2. 2xYT broth

Thyptone	16	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
NaCl	5	กรัม

ซึ่งส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร และนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

การเตรียมสารเคมีในการตรวจสอบโปรตีน

1. Bradford's reagent

0.01% Coomassie brilliant blue G250	0.1	กรัม
10% Phosphoric acid	100	มิลลิลิตร

ซึ่ง Coomassie brilliant blue G250 และละลายด้วย 95% ethanol ปริมาณเล็กน้อยก่อนและตวงส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายเข้าด้วยกันจะได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร จากนั้นกรองผ่านกระดาษ Whatman No. 1 และห่อด้วย aluminium foil เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. 2X SDS-PAGE sample buffer

0.2 M Tris, pH 6.8	6.25	มิลลิลิตร
10% SDS	40	มิลลิลิตร
0.02% Bromophenol blue	0.02	กรัม
16% Glycerol	16	มิลลิลิตร
5% 2-Mercapto ethanol	5	มิลลิลิตร

ชั่ง และตวงส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายเข้าด้วยกัน และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ

3. 5X SDS-PAGE running buffer

Tris base	15.1	กรัม
Glycine	94	กรัม
10% (w/v) SDS	50	มิลลิลิตร

ชั่ง และตวงส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายเข้าด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

4. Tris-glycine SDS-PAGE 5% Stacking

H ₂ O	2.7	มิลลิลิตร
1 M Tris, pH 6.8	0.5	มิลลิลิตร
30% Polyacrylamide	0.67	มิลลิลิตร
10% SDS	0.04	มิลลิลิตร
10% Ammonium persulfate	0.04	มิลลิลิตร
TEMED	0.004	มิลลิลิตร

ตวงส่วนประกอบตามปริมาตรข้างต้น ละลายเข้าด้วยกันจะได้ปริมาตรเป็น 4 มิลลิลิตร

5. Tris-glycine SDS-PAGE 12% Separating

H ₂ O	3.3	มิลลิลิตร
1 M Tris, pH 8.8	2.5	มิลลิลิตร
30% Polyacrylamide	4.0	มิลลิลิตร
10% SDS	0.1	มิลลิลิตร
10% Ammonium persulfate	0.1	มิลลิลิตร
TEMED	0.004	มิลลิลิตร

ตวงส่วนประกอบตามปริมาตรข้างต้น ละลายเข้าด้วยกันจะได้ปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร

6. Protein staining solution

0.2% Coomassie brilliant blue R250	2	กรัม
45% Methanol	450	มิลลิลิตร
45% Distilled water	450	มิลลิลิตร
10% Gracial acetic acid	100	มิลลิลิตร

ชั่ง และตวงส่วนประกอบตามปริมาตรข้างต้น ละลายเข้าด้วยกันจะได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

7. Destaining solution

25% Methanol	250	มิลลิลิตร
68% Distilled water	680	มิลลิลิตร
7% Gracial acetic acid	70	มิลลิลิตร

ตวงส่วนประกอบตามปริมาตรข้างต้น ละลายเข้าด้วยกันจะได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

8. Lysis buffer

100 mM NaH_2PO_4	6.90	กรัม
300 mM NaCl	17.54	กรัม
10 mM Imidazole	0.68	กรัม

ซึ่งส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย NaOH และเติมน้ำให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

9. Wash buffer

50 mM NaH_2PO_4	6.90	กรัม
300 mM NaCl	17.54	กรัม
20 mM Imidazole	1.36	กรัม

ซึ่งส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย NaOH และเติมน้ำให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

10. Elution buffer

50 mM NaH_2PO_4	6.90	กรัม
300 mM NaCl	17.54	กรัม
250 mM Imidazole	17.0	กรัม

ซึ่งส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย NaOH และเติมน้ำให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

11. Phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4

NaCl	8.0	กรัม
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.9	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.2	กรัม
KCl	0.2	กรัม

ชั่งส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7.4 และเติมน้ำให้ได้ ปริมาตร 1 ลิตร

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ นางสาวณัฐชานันท์ วิบูลย์โชติกร
เกิดวันที่ 19 กรกฎาคม 2528
สถานที่เกิด จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร) เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
ทุนการศึกษาที่ได้รับ ได้รับการสนับสนุนเป็นบัณฑิตผู้ช่วยวิจัยจาก ศูนย์ความเป็นเลิศ
ด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัย
ด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สบว) สำนักงานคณะกรรมการ
การอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ