การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *Squash mosaic virus* โดยใช้โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสที่ผลิตได้จากยีนสังเคราะห์เป็นแอนติเจน

Production of *Squash Mosaic Virus*-Specific Polyclonal Antibody Using the Virus Coat Protein Produced from Synthesized Gene as An Antigen

สมฤทัย พุ่มระชัฎ[1] รัชนี ฮงประยูร[1,2,3] สุจินต์ ภัทรภูวดล[1,2,3] และ สรรชัย จันทะจร [2,3]

Somruethai Pumrachat[1], Ratchanee Hongprayoon[1,2,3], Sujin Patarapuwadol[1,2,3] and Sanchai Chantajorn[2,3]

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[2] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[3] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ กรุงเทพฯ 10900

[1] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140 Thailand

[2] Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140 Thailand

[3] Center of Excellence on Agricultural Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900 Thailand

รับเรื่อง: มิถุนายน 2559 Received: June 2016

รับตีพิมพ์: กรกฎาคม 2559 Accepted: July 2016

* Corresponding author: agrrat@ku.ac.th

ABSTRACT: Squash Mosaic Virus (SqMV) is one of the causal agents of virus diseases infecting cucurbits causing damage to their products. It is transmitted primarily by some beetles and also reported that the virus can spread through melon seeds. The occurrence of this disease has not been reported in Thailand yet. Nevertheless, Thailand shares a big market of imported and exported cucurbit seed therefore SqMV may become a threat on cucurbit production. This research aimed to produce SqMV recombinant coat protein and used it as an antigen to produce a specific antibody for further development of an effective detection assay. Large and small coat protein genes were synthesized based on the nucleotide sequences of the melon strain (Group 1) of SqMV (GenBank database: Accession number NC_003800.1). The synthesized gene was 1,677 nucleotides in length and the deduced amino acid sequences was 570 residues encoding 62.77 kDa of the SqMV recombinant coat proteins (rSqMV–CP). This protein was tested to confirm their native epitopes by reacting with a commercial SqMV antibody before use as an antigen for polyclonal antibody production in rabbit. The antiserum had been collected for 11 weeks and the highest titer was present in week 11 at 102,800 determined by indirect plate-trapped antigen enzyme-linked immunosorbent assay. The diluted antiserum at 1:1,000 was used to react with commercially available SqMV positive controls and other viruses. High specificity to SqMV without cross reaction with 21 species of other viruses brought into examination was observed which included *Cucumber leaf curl virus, Cowpea mosaic virus,*

Cucumber mosaic virus I, *Cucumber mosaic virus* II, *Chili veinal mottle virus, Papaya ringspot virus, Potato virus Y, Tobacco etch virus, Zucchini yellow mosaic virus, Cucumber green mottle mosaic virus, Pepper mild mottle virus, Tobacco mosaic virus, Capsicum chlorosis virus, Groundnut bud necrosis virus, Groundnut ringspot virus, Impatiens necrotic spot virus, Iris yellow spot virus, Melon yellow spot virus, Tomato chlorotic spot virus, Tomato spotted wilt virus, Watermelon silver mottle virus.*

Keywords: *Squash mosaic virus*, coat protein gene, recombinant protein, antibody, ELISA

Agricultural Sci. J. (2017) Vol. 48(1): 89–99 ว. วิทย. กษ. (2560) 48(1): 89–99

บทคัดย่อ

Squash mosaic virus (SqMV) เป็นเชื้อไวรัสสาเหตุโรคที่เข้าทำลายพืชตระกูลแตงซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายกับผลิตผลของพืชตระกูลแตง SqMV สามารถถ่ายทอดโรคผ่านทางด้วงบางชนิดและทางเมล็ดพันธุ์ ซึ่งในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการระบาดของโรค อย่างไรก็ตาม เนื่องจากประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์พืชตระกูลแตงจากต่างประเทศ จึงมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคลูกผสมของเชื้อ SqMV และใช้เป็นแอนติเจนในการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสำหรับการพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ SqMV ที่มีประสิทธิภาพต่อไป โดยได้สั่งสังเคราะห์ large และ small coat protein genes ของ SqMV กลุ่มที่ 1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เข้าทำลายเมล่อน จากฐานข้อมูล GenBank: Accession number NC_003800.1 พบว่ายีนที่สังเคราะห์ได้มีความยาว 1,677 นิวคลีโอไทด์ และแปลรหัสให้กรดอะมิโนจำนวน 570 เรสิดิวส์ โปรตีนลูกผสมมีขนาด 62.77 kDa และสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีทางการค้าได้ จึงนำไปเป็นแอนติเจนฉีดเข้าสัตว์ทดลองเพื่อผลิตแอนติบอดี โดยเจาะเลือดทั้งหมด 11 สัปดาห์ ตรวจค่าไตเตอร์ด้วยวิธี Indirect plate–trapped antigen enzyme–linked immunosorbent assay พบว่าแอนติบอดีมีค่าไตเตอร์สูงสุดในสัปดาห์ที่ 11 เท่ากับ 102,800 เมื่อนำแอนติซีรัมมาเจือจาง 1:1,000 และทำปฏิกิริยากับเชื้อควบคุม SqMV ที่มีจำหน่ายทางการค้าและเชื้อไวรัสพืชชนิดอื่น พบว่าสามารถทำปฏิกิริยาได้อย่างจำเพาะโดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อไวรัสชนิดอื่นอีก 21 ชนิดที่นำมาทดสอบ ได้แก่ *Cucumber leaf curl virus, Cowpea mosaic virus, Cucumber mosaic virus* I, *Cucumber mosaic virus* II, *Chili veinal mottle virus, Papaya ringspot virus, Potato virus Y, Tobacco etch virus, Zucchini yellow mosaic virus, Cucumber green mottle mosaic virus, Pepper mild mottle virus, Tobacco mosaic virus, Capsicum chlorosis virus, Groundnut bud necrosis virus, Groundnut ringspot virus, Impatiens necrotic spot virus, Iris yellow spot virus, Melon yellow spot virus, Tomato chlorotic spot virus, Tomato spotted wilt virus, Watermelon silver mottle virus.*

คำสำคัญ: เชื้อไวรัสใบด่างสควอช, ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค, โปรตีนลูกผสม, แอนติบอดี, อีไลซ่า

บทนำ

พืชตระกูลแตง (Cucurbitaceae) เป็นพืชที่เหมาะสมกับสภาพภูมิอากาศของประเทศไทย จึงนิยมปลูกกันมากในพื้นที่ต่าง ๆ ทั่วประเทศ เช่น แตงกวา แตงโม บวบ ฟักทอง มะระ แคนตาลูป เป็นต้น มีการส่งออกเมล็ดพันธุ์ของพืชตระกูลแตงติดอันดับ 1 ใน 10 ของเมล็ดพันธุ์ที่มีการส่งออกมากที่สุดของประเทศไทย (Thai Seed Trade Association, 2015) เชื้อไวรัสสำคัญที่เข้าทำลายพืชตระกูลแตงมีหลายชนิด เช่น *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Papaya ring spot virus* type W (PRSV–W), *Squash mosaic virus* (SqMV), *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) และ *Melon yellow spot virus* (MYSV) เป็นต้น สำหรับเชื้อ SqMV มีการรายงานครั้งแรกในรัฐแคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกาปี ค.ศ. 1934 (Kendrick, 1934) ปัจจุบันจัดอยู่ในวงศ์ *Comoviridae* สกุล *Comovirus* อนุภาคของไวรัสเป็นทรงกลม (icosahedral) เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 28–30 นาโนเมตร จีโนมมีลักษณะเป็น bipartite ชนิดอาร์เอ็นเอเส้นบวกสายเดี่ยว (positive single–stranded RNA) (Hu *et al*., 1993) โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ 2 ขนาด คือ 40–45 kDa และ 21–27 kDa (James and Palukaitis, 1998) สามารถถ่ายทอดโรคผ่านด้วงเต่าแตง ได้แก่ *Aaclymma* spp. และ *Diabrotica* spp. (Freitag, 1956) นอกจากนั้นยังถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ดพันธุ์ (Alvarez and Campbell, 1978) โดยอยู่ในส่วนของคัพภะ (Nolan and Campbell, 1984) เนื่องจากประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์พืชตระกูลแตงจากต่างประเทศจึงมีโอกาสพบการปนเปื้อนของเชื้อในเมล็ดพันธุ์ได้ SqMV ได้รับการจัดให้เป็นศัตรูพืชที่มีความเสี่ยงสูงในการแพร่ระบาดสู่แปลงปลูกของเกษตรกร นอกจากนี้ยังไม่มีการรายงานการผลิตแอนติบอดีต่อ SqMV ในประเทศไทยเพื่อใช้ในการตรวจสอบ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ SqMV โดยใช้โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคลูกผสมของเชื้อ SqMV ซึ่งได้จากยีนสังเคราะห์ของ large coat protein และ small coat protein และศึกษาคุณสมบัติของแอนติบอดีที่ผลิตได้

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SqMV จากฐานข้อมูล GenBank

เนื่องจากในประเทศไทยไม่มีรายงานการพบเชื้อ SqMV ระบาดในประเทศไทยจึงไม่สามารถเตรียมอนุภาคไวรัสโดยการแยกให้บริสุทธิ์จากพืชเพื่อใช้ในการทดลองได้ จึงสั่งสังเคราะห์ SqMV coat protein gene (SqMV–CP gene) จากบริษัท Invitrogen (USA) โดยใช้ฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) ได้แก่ large coat protein gene และ small coat protein gene ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์รวมทั้งหมด 1,677 นิวคลีโอไทด์ (Accession number NC_003800.1) (Han *et al*., 2002) เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์โปรตีนขั้นตอนต่อไป

2. การวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนจากการแสดงออกของยีนสังเคราะห์ SqMV coat protein gene

วิเคราะห์คุณสมบัติ SqMV–CP gene โดยใช้โปรแกรมดังนี้ ProtParam (http://www.expasy.ch/tools/protparam.html), ProtScale (http://www.expasy.ch/tools/protscale.html), CPHmodels 2.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/), Swiss-Pdb Viewer 3.7 (SP5) และIEDB analysis resource (http://tools.iedb.org/bcell/result/) เพื่อใช้ตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพต่าง ๆ คุณสมบัติในการละลายน้ำใช้ในการ

วิเคราะห์โครงสร้างสามมิติของโปรตีน และการทำนายตำแหน่ง linear epitope ของโครงสร้างโปรตีน ตามลำดับ

3. การเพิ่มปริมาณและสกัดโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคลูกผสมบริสุทธิ์ของเชื้อ SqMV (rSqMV-CP)

3.1 การเพิ่มปริมาณ SqMV-CP gene

นำ SqMV–CP gene ที่สังเคราะห์มาเพิ่มปริมาณชิ้นยีน โดยกระบวนการ polymerase chain reaction (PCR) ใช้ SqMV–CP forward primer : 5' ATATGAGATCCAATGAGCTAGATCTTGCGCAAC 3' และ SqMV–CP reverse primer: 5' ATATGCTGCAGTTAGGAAAGCAAAATAGGTGG 3' ปฏิกิริยาสำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นยีนมีดังนี้ DNA template 2 ไมโครลิตร, 10x PCR buffer 5 ไมโครลิตร, 50 mM $MgSO_4$ 2 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP 2 ไมโครลิตร, Forward primer (10μM) 1 ไมโครลิตร, Reverse primer (10 μM) 1 ไมโครลิตร, Platinum Taq DNA polymerase high fidelity (5 ยูนิต/ไมโครลิตร) 0.4 ไมโครลิตร และ nuclease–free deionized water 36.6 ไมโครลิตร ปริมาตรของปฏิกิริยารวม 50 ไมโครลิตร โดยอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน PCR คือ pre–denaturation 94 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที; denaturation 94 องศาเซลเซียส นาน 24 วินาที; annealing 56 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที; extension 94 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที เริ่มกระบวนการที่ 2–4 ซ้ำอีก 34 รอบ และ final extension 68 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที ลดอุณหภูมิลงมาที่ 17 องศาเซลเซียส และนำไปวิเคราะห์ผลด้วย 1% agarose gel electrophoresis

3.2 การโคลน SqMV-CP gene เข้าสู่ expression vector

นำ SqMV–CP gene ที่ได้จากการสังเคราะห์มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Bam*HI และ *Pst*I (Fermentas, USA) ด้วยวิธี double digestion (Fermentas, USA) แยก SqMV–CP gene ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain (LONZA, USA) สกัดชิ้นจีโนมออกจากเจลด้วย FravoPrep™ GEL/PCR Purification Mini kit (Favorgen, Taiwan) นำไปเชื่อมต่อกับ pQE30 expression vector (Qiagen, USA) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันด้วยเอนไซม์ T4–ligase (Invitrogen, USA) และถ่ายฝากให้กับเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ M15 ด้วยวิธีการ heat shock transformation (Sambrook and Russel, 1989) นำเซลล์ไปเลี้ยงบนอาหาร 2xYT agar ที่มีสารปฏิชีวนะ 2 ชนิด คือ แอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และกานามัยซิน 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร คัดเลือกโคโลนีสีขาวเพื่อนำมาตรวจหาชิ้นส่วน SqMV–CP gene โดยวิธี PCR จากนั้นเลือกโคโลนีที่ให้ผลบวกนำไปส่งวิเคราะห์ลำดับเบสกับบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี

3.3 การเตรียม rSqMV-CP

นำโคโลนีที่ให้ผลบวกที่ผ่านการตรวจสอบในข้อ 3.2 มาใช้ในการผลิต rSqMV–CP โดยเลี้ยงเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ M15 ที่มี SqMV–CP gene แทรกอยู่ใน pQE30 expression vector ในอาหาร 2xYT ปริมาตร 1 ลิตร ที่เติมแอมพิซิลลินและกานามัยซินเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และชักนำให้เกิดการสร้างโปรตีนด้วย IPTG โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 mM เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ทิ้งอาหารเลี้ยงเซลล์ และละลายตะกอนเซลล์ด้วย 8 M Urea buffer, pH 8.0 (50 mM Tris base 6.057 กรัม, 1 M NaCl 58.44 กรัม และ 8 M Urea 480.48 กรัม) ปริมาตร 8 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักเปียกของเชื้อ *E. coli* 1 กรัม แช่แข็งเซลล์ด้วยไนโตรเจนเหลวสลับกับการละลาย (freeze/thaw) และปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที นำส่วนใสที่ได้ไหลผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ Ni–NTA resin (Cube Biotech, Germany) โดยทำตามวิธีการของผู้ผลิต ล้างคอลัมน์ด้วย Urea buffer, pH

6.3 ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ และชะ (elute) โปรตีนออกด้วย Urea buffer, pH 4.5 โดยเก็บ fraction ละ 1 มิลลิลิตร แต่ละหลอดจะมี 2M Tris solution 10 ไมโครลิตร เพื่อปรับค่า pH ให้เป็นกลาง และนำไปวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

3.4 การตรวจสอบคุณสมบัติ rSqMV-CP ด้วยวิธี Double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA)

ใช้แอนติบอดีทางการค้าของบริษัท Prime ประเทศเนเธอร์แลนด์ เคลือบหลุม ELISA plate เจือจางแอนติบอดีใน coating buffer อัตราส่วน 1:200 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืนล้าง plate ด้วยบัฟเฟอร์ PBST (NaCl 8 กรัม, $Na_2HPO_4.12H_2O$ 2.9 กรัม, KH_2PO_4 0.2 กรัม, KCl 0.2 กรัม, Tween 20 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร/หลุม จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติม blocking buffer (5% skim milk ใน PBS) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้าง plate ด้วยบัฟเฟอร์ PBST ปริมาตร 200 ไมโครลิตร/หลุม 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติมแอนติเจนต่อไปนี้ rSqMV-CP ตัวอย่างมาตรฐานของเชื้อไวรัส SqMV ที่มีจำหน่ายทางการค้า (purified virus) (Positive control) และน้ำคั้นพืชปกติ (Negative control) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมงล้าง plate ด้วยบัฟเฟอร์ PBST 3 ครั้ง เช่นเดิม เติม anti-SqMV IgG conjugated ด้วย alkaline phosphatase (Prime, Netherland) ที่เจือจางในบัฟเฟอร์ PBS อัตราส่วน 1:200 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้าง plate ด้วยบัฟเฟอร์ PBST 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติมสารละลาย *p*–nitrophenyl phosphate (PNPP) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรใน substrate buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA reader (MultiskanEX, Finland)

4. การผลิตแอนติบอดีต่อrSqMV-CP

4.1 การฉีดสัตว์ทดลอง

ใช้กระต่ายสายพันธุ์ New Zealand White อายุประมาณ 3 เดือน น้ำหนักประมาณ 2–3 กิโลกรัม ฉีด rSqMV-CP บริสุทธิ์ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผสมกับ Freund's complete adjuvant อัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณคอของกระต่าย (subcutaneous injection) จำนวน 3 จุดในครั้งที่ 1 ต่อมาฉีดครั้งที่ 2 และ 3 ในสัปดาห์ที่ 3 และ 9 โดยใช้แอนติเจนผสมกับ Freund's incomplete adjuvant อัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ฉีดเข้ากล้ามเนื้อบริเวณขาหลัง (intramuscular injection) เริ่มเก็บเลือดหลังจากฉีดครั้งที่ 2 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และเก็บต่อไปจนครบ 11 ครั้ง

4.2 การตรวจวัดค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีด้วยวิธี Indirect plate-trapped antigen enzyme-linked immunosorbent assay (Indirect PTA-ELISA)

ดัดแปลงจากวิธีการของ (Clark and Adams, 1977) โดยเคลือบหลุม ELISA plate ด้วย rSqMV–CP ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใน coating buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืนล้าง plate ด้วย PBST 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติม blocking buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมแอนติซีรัมที่เจือจาง 2 เท่า (2–fold dilutions) จำนวน 10 หลอด เริ่มจาก 1:200 ถึง 1: 204,800 ใน blocking buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง plate และเติม goat anti–rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase

(GAR–AP) (Sigma, USA) ที่เจือจางใน blocking buffer อัตราส่วน 1:30,000 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ขั้นตอนต่อไปทำเช่นเดียวกับข้อ 3.4

4.3 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ผลิตได้กับตัวอย่างมาตรฐานของเชื้อไวรัส SqMV ที่มีจำหน่ายทางการค้าและเชื้อไวรัสชนิดอื่นด้วยวิธี Indirect PTA-ELISA

ใช้ตัวอย่างมาตรฐานของเชื้อไวรัส SqMV ที่มีจำหน่ายทางการค้าจากบริษัท Prime ประเทศเนเธอร์แลนด์ และเชื้อไวรัสชนิดอื่นอีก 21 ชนิด (โดยใช้ตัวอย่าง positive control ที่มีจำหน่ายทางการค้าจากบริษัท Agdia และตัวอย่างน้ำคั้นใบพืชจากต้นที่เป็นโรค) เคลือบหลุมของ ELISA plate ด้วยน้ำคั้นใบพืชที่บดอัตราส่วน 1:10 ใน coating buffer ส่วนตัวอย่างมาตรฐานจากบริษัทจะเตรียมตามคำแนะนำของบริษัทโดยใช้ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืนเติมแอนติซีรัมครั้งที่ 11 เจือจาง 1: 1,000 ใน blocking buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำตามวิธีในข้อ 4.2

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การสังเคราะห์ยีนและวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคลูกผสมของเชื้อ SqMV

การสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ SqMV–CP gene จากฐานข้อมูล GenBank ได้ยีนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 1,677 นิวคลีโอไทด์สามารถแปลรหัสให้ได้กรดอะมิโนจำนวน 570 เรสิดิวส์ ดังนี้

MRGSHHHHHHGSNELDLAQLSLDDTSSLRG
SALQTKLATSRVILSKTMVGNTVLREDLLATFLQDS
NERAAIDLIRTHVIRGKIRCVASINVPENTGCALA
ICFNSGITGAADTDIYTTSSQDAIVWNPACEKAVELS
FNPNPCGDAWNFVFLQQTKAHFAIQCVTGWT
TTPLTDLALVLTWHIDRSLCVPKILTISSAHASF PINR
WMGKLSFPQGPARVLKRMPLAIGGGAGTKDAI LM
NMPNAVISLHRYFRGDFVFEITKMSSPYIKATIAFFI
AFGDITEEMTNLESFPHKLVQFAEIQGRTTIT
FTQSEFLTAWSTQVLSTVNPQKDGCPHLYALLHD
SATSTIEGNFVIGVKLLDIRNYRAYGHNPGFEGARLL
GISGQSTMVQQLGTYNPIWMVRTPLESTAQQNFAS
FTADLMESTISGDSTGNWNITVYPSPIANLLK
VAAWKKGTIRFQLICRGAAVKQSDWAASARIDLINN
LSNKALPARSWYITKPRGGDIEFDLEIAGPNNGFE
MANSSWAFQTTWYLEIAIDNPKQFTPFELNA
CLMEDFEVAGNTLNPPILLS

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไปวิเคราะห์คุณสมบัติของการละลายน้ำโดยใช้โปรแกรม ProtScale จากการคำนวณทำให้ทราบว่า SqMV–CP gene มีค่า Grand average of hydropathicity (GRAVY) เท่ากับ -0.032 ซึ่งหมายความว่าโปรตีนมีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้น้อย โปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 62.77 KDa มีค่า isoelectric point (pI) เท่ากับ 6.43 และสูตรโครงสร้างของโปรตีนดังนี้ $C_{2811}H_{4377}N_{761}O_{825}S_{23}$

การวิเคราะห์โครงสร้างสามมิติโดยใช้โปรแกรม CPHmodels 2.0, Swiss–Pdb viewer 4.10 และโปรแกรม IEBD analysis resource (Figure 1) ทำให้ทราบเบื้องต้นถึงลักษณะโครงสร้างโปรตีนในตำแหน่งที่สามารถเป็นแอนติเจนได้ดี คือส่วนของโปรตีนที่มีลักษณะเป็น linear epitope ซึ่งมีจำนวน 14 ตำแหน่งที่บริเวณลำดับกรดอะมิโนดังนี้ 79–84, 96–113, 127–134, 155–161, 201–208, 218–224, 315–323, 356–364, 394–400, 413–422, 455–463, 485–493, 500–508, 526–532 โดยอิพิโทปลักษณะนี้มีข้อดีคือจะยังคงรูปร่างเดิมเสมอแม้ว่าโปรตีนจะมีการเสื่อมสภาพ (denatured protein) ทั้งนี้เนื่องจากในขั้นตอนการทำให้โปรตีน rSqMV–CP บริสุทธิ์ จำเป็นต้องใช้บัฟเฟอร์ซึ่งมีองค์ประกอบของยูเรียที่ทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพ แต่การที่

อิพิโทปเป็นชนิด linear epitope จะทำให้มั่นใจได้ว่าอิพิโทปดังกล่าวจะยังคงอยู่

2. การเพิ่มปริมาณและสกัดโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคลูกผสมบริสุทธิ์ของเชื้อ SqMV

2.1 การเพิ่มปริมาณและการโคลน SqMV-CP gene เข้าสู่ expression vector

จากการเพิ่มปริมาณ SqMV-CP gene โดยเทคนิค PCR ได้ดีเอ็นเอที่มีขนาด 1,677 นิวคลีโอไทด์ เมื่อนำไปเชื่อมต่อเข้ากับ pQE30 expression vector และถ่ายฝากให้กับ *E. coli* สายพันธุ์ M15 สุ่มเลือกโคโลนีเดี่ยวจำนวน 5 โคโลนี เพื่อนำไปตรวจสอบยืนด้วยวิธี PCR โดยใช้ primers ที่มีความจำเพาะ พบว่าได้ผลเป็นบวกทั้ง 5 โคโลนี โดยปรากฏแถบของยีนขนาด 1,677 นิวคลีโอไทด์ เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (Figure 2a) ผลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสพบว่าตรงกับลำดับเบสจากฐานข้อมูล GenBank Accession number NC_003800.1 ที่ระดับ 99 เปอร์เซ็นต์ การตรวจสอบ rSqMV–CP ด้วยวิธี SDS–PAGE พบว่าโปรตีนลูกผสมมีขนาด 62.77 kDa (Figure 2b)

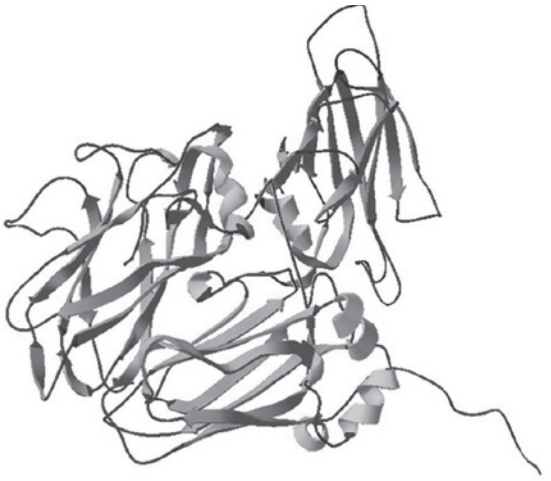

Figure 1 Three-dimensional structure of rSqMV-CP analysed by Swiss-Pdb Viewer Program

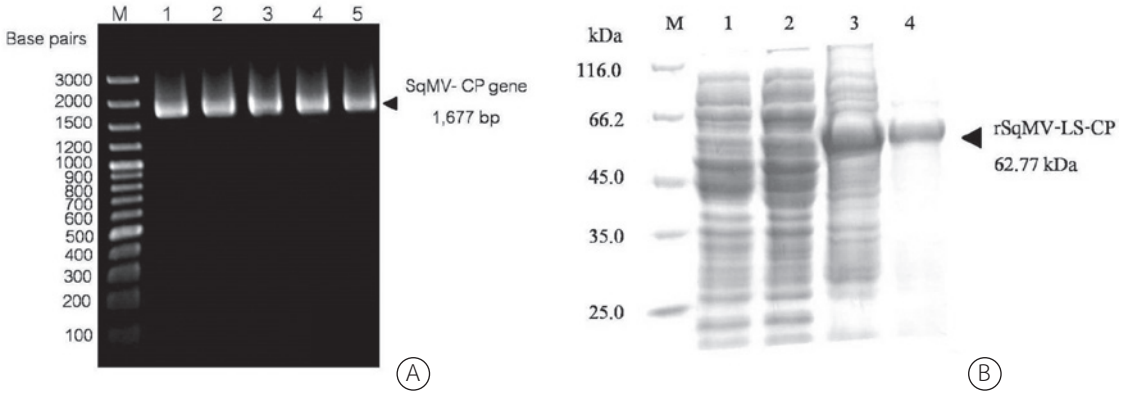

Figure 2 (a) Characterization of SqMV-CP gene insertion of five transformants (lane 1-5) by PCR compared to DNA molecular weight markers (M, 100 bp Plus DNA Ladder) and (b) SDS- PAGE analysis of the expressed recombinant SqMV- CP protein in *E. coli* strain M15. Lane M: unstained protein markers; lane 1: Cell lysis of *E. Coli* strain M15; lane 2: total protein from *E. coli* strain M15 transformed with pQE30 rSqMV-CP, non-induced by IPTG. lane 3: total protein from *E. coli* strain M15 transformed with pQE30 rSqMV-CP, after 6 hr induction by IPTG, lane4: Purified rSqMV-CP protein by Ni-NTA column chromatography.

2.2 การตรวจสอบคุณสมบัติ rSqMV-CP ด้วยวิธี DAS-ELISA

การตรวจสอบคุณสมบัติในการเป็นแอนติเจนของ rSqMV–CP ที่ผลิตได้ โดยให้ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ SqMV ทางการค้า ซึ่งใช้เชื้อ SqMV ในธรรมชาติเป็นแอนติเจน (ข้อมูลจากบริษัทผู้ผลิต) พบว่าโปรตีนลูกผสมที่ผลิตได้สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีทางการค้า โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร เท่ากับ 0.650 ซึ่งเป็น 2 เท่าของค่าที่ได้จากการทำปฏิกิริยากับพืชปกติ (Negative control มีค่า $O.D._{405}$ = 0.310) แสดงว่าโปรตีนลูกผสมที่ผลิตได้ยังคงมีอิพิโทปที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีได้ จึงนำโปรตีนลูกผสมดังกล่าวมาเป็นแอนติเจนในการผลิตแอนติบอดีต่อไป

3. การผลิตแอนติบอดีต่อ rSqMV-CP

จากการเก็บเลือดเป็นเวลา 11 สัปดาห์ เมื่อนำไปทดสอบค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมในแต่ละสัปดาห์ โดยใช้ rSqMV–CP เป็นแอนติเจนพบว่าค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมที่เก็บได้ในสัปดาห์ที่ 1–3, 4–6, 7–9, 10, และ 11 มีค่าเท่ากับ 12,800, 25,600, 12,800, 25,600 และ 102,800 ตามลำดับโดยมีค่าสูงสุดในสัปดาห์ที่ 11

การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ผลิตได้กับตัวอย่างมาตรฐานเชื้อไวรัส SqMV และไวรัสชนิดอื่นด้วยวิธี Indirect PTA–ELISA พบว่า แอนติบอดีทำปฏิกิริยากับตัวอย่างทางการค้าได้อย่างจำเพาะ โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร เท่ากับ 0.685 (ค่า cut off เท่ากับ 2 เท่าของพืชปกติทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อเชื้อ SqMV คือ 0.404) โดยแอนติบอดีไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับน้ำคั้นพืชปกติ และพืชตัวอย่างที่ติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นอีก 21 ชนิด ที่นำมาทดสอบ (Table 1) ดังนั้นแอนติซีรัมที่ผลิตได้มีความสามารถนำไปตรวจเชื้อ SqMV ในธรรมชาติได้จริง แต่ในระยะเวลาที่ทำการทดลองยังไม่สามารถหาตัวอย่างพืชเป็นโรคได้ จึงยังไม่สามารถทดสอบกับตัวอย่างพืชที่ติดเชื้อในธรรมชาติ

Table1 Specificity test of anti-SqMV antibody at 1:1,000 dilution against rSqMV-CP and other viruses by Indirect PTA–ELISA

Genus	Species	Type of antigen/source	O.D.$_{405}$*	Result
Begomovirus	*Cucumber leaf curl virus* (CuLCV)	sap/cucumber	0.211	-
Comovirus	***Squash mosaic virus* (SqMV)**	**positive control/Prime**	0.685	+
	Cowpea mosaic virus (CPMV)	positive control/Agdia	0.201	-
Cucumovirus	*Cucumber mosaic virus* I (CMV I)	positive control/Agdia	0.192	-
	Cucumber mosaic virus II (CMV II)	positive control/Agdia	0.188	-
Potyvirus	*Chili veinal mottle virus* (ChiVMV)	sap/thorn apple	0.211	-
	Papaya ringspot virus (PRSV)	sap/pumpkin	0.176	-
	Potato virus Y (PVY)	sap/potato	0.198	-
	Tobacco etch virus (TEV)	positive control/Agdia	0.204	-
	Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)	sap/cucumber	0.233	-
Tobamovirus	*Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV)	sap/cucumber	0.207	-
	Pepper mild mottle virus (PMMoV)	positive control/Agdia	0.210	-
	Tobacco mosaic virus (TMV)	sap/tobacco	0.245	-
Tospovirus	*Capsicum chlorosis virus* (CaCV)	positive control/Agdia	0.211	-
	Groundnut bud necrosis virus (GBNV)	positive control/Agdia	0.285	
	Groundnut ringspot virus (GRSV)	positive control/Agdia	0.186	-
	Impatiens necrotic spot virus (INSV)	positive control/Agdia	0.184	-
	Iris yellow spot virus (IYSV)	positive control/Agdia	0.193	-
	Melon yellow spot virus (MYSV)	positive control/Agdia	0.189	
	Tomato chlorotic spot virus (TCSV)	positive control/Agdia	0.186	-
	Tomato spotted wilt virus (TSWV)	positive control/Agdia	0.186	-
	Watermelon silver mottle virus (WSMoV)	positive control/Agdia	0.285	-
Negative control	pumpkin	Healthy	0.202	-

* Values are from duplicates and compared to the negative control which was healthy plant sap reacting with anti–SqMV antibody. A cut off value is twice of the average value from the negative control (0.404).

สรุป

การสังเคราะห์ SqMV coat protein gene จากฐานข้อมูลใน GenBank Accession number NC_003800.1 ประกอบด้วย small coat protein gene และ large coat protein gene ได้ยีนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ยาว 1,677 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสให้กรดอะมิโนทั้งหมด 570 เรสิดิวส์ เมื่อนำมาเพิ่มปริมาณของยีนและโคลนเข้าสู่ pQE30 expression vector พบว่า ยีนมีการแสดงออกภายในเซลล์ *E. coli* M15 จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS–PAGE พบว่า โปรตีนลูกผสมมีขนาด 62.77 kDa และสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีทางการค้า จึงนำไปเป็นแอนติเจนฉีดเข้าสัตว์ทดลองเพื่อผลิตแอนติบอดีโดยการฉีดกระต่ายเจาะเลือดทั้งหมด 11 สัปดาห์ พบว่ามีไตเตอร์อยู่ระหว่าง 12,800 – 102,800 เมื่อนำแอนติซีรัมมาตรวจสอบความจำเพาะพบว่ามีความจำเพาะสูงกับเชื้อ SqMV ทางการค้า โดยไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับพืชปกติและเชื้อไวรัสอีก 21 ชนิดที่นำมาทดสอบ ได้แก่ CaCV, CMV I, CMV II, CGMMV, ChiVMV, CPMV, CuLCV, GBNV, GRSV, INSV, IYSV, MYSV, PMMoV, PRSV, PVY, TEV, TMV, TCSV, TSWV, ZYMV และ WSMoV แอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะสูงกับ SqMV และไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับไวรัสที่เข้าทำลายพืชวงศ์แตงจำนวน 15 ชนิดที่นำมาทดสอบ จึงเหมาะสำหรับนำไปตรวจเชื้อ SqMV ในพืชตระกูลแตงได้อย่างจำเพาะ เนื่องจากเชื้อ SqMV ที่มีรายงานอยู่ 2 กลุ่ม (Nelson and Knuhtsen, 1973) คือ กลุ่มที่ 1 เข้าทำลายแคนตาลูปและเมล่อนซึ่งจะแสดงอาการรุนแรง แต่เมื่อเข้าทำลายฟักทองและสควอซจะแสดงอาการไม่รุนแรง นอกจากนั้นเชื้อกลุ่มนี้สามารถเข้าทำลายแตงโมได้ ส่วนกลุ่มที่ 2 จะทำให้ฟักทอง และสคอวซแสดงอาการรุนแรง แต่อาการจะไม่รุนแรงเมื่อเชื้อเข้าทำลายแคนตาลูปและเมล่อน และจะไม่เข้าทำลายแตงโม ดังนั้นจึงควรมีการตรวจสอบต่อไปว่าแอนติบอดีมีความจำเพาะกับเชื้อ SqMV กลุ่มเดียวหรือทั้งสองกลุ่ม นอกจากนั้นข้อดีของแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นอีกประการหนึ่งคือลดขั้นตอนของ ELISA เนื่องจากแอนติบอดีที่มีจำหน่ายทางการค้าจะใช้วิธีการตรวจแบบ DAS–ELISA โดยมีแอนติบอดี 2 ชนิด และมีราคาแพง ส่วนแอนติบอดีที่ผลิตได้ในงานวิจัยนี้สามารถใช้วิธีการ Indirect PTA–ELISA ซึ่งให้ผลเทียบเท่ากับวิธี DAS–ELISA ของชุดตรวจสอบเชื้อ SqMV จากบริษัท Prime (ไม่ได้แสดงผล) จึงเป็นแอนติบอดีทางเลือกที่จะนำไปใช้ในการตรวจเชื้อ SqMV เพื่อลดการนำเข้าแอนติบอดีจากบริษัทต่างประเทศและยังสามารถนำแอนติบอดีจากงานวิจัยนี้ไปพัฒนาต่อยอดในการผลิตชุดตรวจสอบแบบรวดเร็วต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนบัณฑิตศึกษา สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปี 2557 และขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้การสนับสนุนเครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์ที่จำเป็นต่องานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Alvarez, M. and R.N. Campbell. 1978. Transmission and distribution of *Squash mosaic virus* in seeds of cantaloupe. Phytopathology 68: 257–263.

Clark, M.K. and A.N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of the enzyme–linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34: 475–483.

Freitag, J.H. 1956. Beetle transmission, host range and properties of *Squash mosaic virus*. Phytopathology 46: 73–81.

James, S.H. and P. Palukaitis. 1998. Diversity among isolates of *Squash mosaic virus*. J. Gen. Virol. 79: 2331–2341.

Han, S.S., K. Yoshida, A.V. Karasevand and T. Lwanami. 2002. Nucleotide sequence of a Japanese isolate of *Squash mosaic virus*. Arch. Virol. 147(2): 437–443.

Kendrick, J.B. 1934. Cucurbit mosaic transmission by muskmelon seed. Phytopathology 24: 820–823.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacterio phage T4. Nature 227: 680–685.

Nelson, M.R. and H.K. Knuhtsen. 1973. *Squash mosaic virus* variability: Review and serological comparisons of six biotype. Phytopathology 63: 920–926.

Nolan, P.A. and R.N.Campbell. 1984. *Squash mosaic virus* detection in individual seed and seed lost of cucurbits by enzyme–linked immunosorbent assay. Plant Dis. 68: 971–975.

Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.1.660 pp.

Thai Seed Trade Association. 2015. Factor of product value export seed 2015. Available Source: http://www.thasta.com/web/index.php, May 14, 2015. (in Thai)