# ความเสถียรของ Infectious Clone เชื้อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ (PRSV–P) ในพลาสมิดพาหะ

# Stability of Infectious Full–Length cDNA Clones of *Papaya Ringspot Virus* Type P Genome

**ชุติรัตน์ อัศวเทพ[1,2] จุฑาเทพ วัชระไชยคุปต์[1,2] สุจินต์ ภัทรภูวดล[1,2,3] และ วิชัย โฆสิตรัตน[1,2,3,*]**

**Chutirat Assawathep[1,2], Jutatape Watcharachaiyakup[1,2], Sujin Patarapuwadol[1,2,3] and Wichai Kositratana[1,2,3,*]**

[1] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[2] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

[3] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

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

[2] Center of Excellence on Agricultural Biotechnology, Science and Technology Postgraduate Education and Research Development Office, Commission on Higher Education, Ministry of Education (AG–BIO/PERDO–CHE), Bangkok 10900, Thailand

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

รับเรื่อง: กรกฎาคม 2559 Received: July 2016

รับตีพิมพ์: สิงหาคม 2559 Accepted: August 2016

[*] Corresponding author: agrwck@ku.ac.th

**ABSTRACT:** Two recombinant plasmids of the infectious clones of Papaya ringspot virus type P (PRSV–P) containing the full–length cDNA of PRSV–P Thai strain, pCF17_7 and pCF17_8, were investigated for plasmid stability. The *in vivo* transcript cDNA clones derived from a full–length of PRSV–SMK5 RNA with 10,323 nucleotides of PRSV–P RNA with ten non–viral nucleotides at the 5´ end and fourteen non–viral nucleotides at the 3´ end following with poly(A)35 tail. The full–length cDNA clones of PRSV–SMK5 were constructed by sequential cloning and overlap extension PCR and under the control of a partially duplicated Cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter and terminated with a CaMV 35S terminator on pCass2 plasmid vector. Stability of pCF17_7, pCF17_8 and their backbone plasmid, pCass2, during their amplifications in a bacterial host, *Escherichia coli* DH5–α strain, ten randomly selected colonies were separately grown in LB liquid medium containing 100 ppm of ampicillin for 24 hours with constant shaking. Then, each culture was refreshed by diluting and growth was continued to a total of ten passages. At the end of each passage, the plasmid was rapidly extracted by using alkaline lysis and visualized by agarose gel electrophoresis. The results showed that pCF17_7, pCF17_8 and pCass2 were stable, intact and infection on tested papaya seedlings after ten passages of plasmid propagation in *E. coli.*

**Keywords:** Plasmid stability, virus infectious clone, *Potyvirus*, *Papaya ringspot virus* (PRSV)

Agricultural Sci. J. (2017) Vol. 48(2): 200–207 ว. วิทย. กษ. (2560) 48(2): 200–207

## บทคัดย่อ

นำโคลนของพลาสมิด pCF17_7 และ pCF17_8 ซึ่งเป็น infectious clone ของเชื้อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนชนิดพี (*Papaya ringspot virus* type P; PRSV–P) ประกอบด้วย cDNA เต็มสายของจีโนมเชื้อ PRSV–SMK5 ที่มีความยาวของอาร์เอ็นเอจีโนม 10,323 นิวคลีโอไทด์ (nts) และมีนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ใช่ของไวรัส 10 nts และ 14 nts ที่ปลาย 5´ และปลาย 3´ ตามลำดับ และตามด้วยปลาย 3´poly(A) จำนวน 35 nts ที่ถ่ายพลาสมิดเข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* DH5–α มาวิเคราะห์ความเสถียรของพลาสมิดโดยโคลน cDNA สายเต็มของ PRSV–SMK5 สร้างขึ้นด้วยการโคลนนิ่งแบบต่อเนื่องเป็นลำดับและเทคนิค overlap extension PCR cloning ควบคุมด้วยชุดโปรโมเตอร์ *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S จำนวนสองชุดต่อเนื่องกัน และหยุดการถอดรหัสด้วย CaMV 35S terminator ในพลาสมิดเวคเตอร์ pCass2 พบว่าพลาสมิด pCF17_7 และ pCF17_8 และพลาสมิดโครงสร้าง pCass2 ยังคงความเสถียรเมื่อผ่านการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบย้ายเชื้อต่อเนื่องกันสิบรอบ (passage) โดยสุ่มเลือกสิบโคโลนีมาเลี้ยงในอาหารคัดเลือก LB ที่เติม Ampicillin 100 ppm เขย่านานรอบละ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้มาเจือจางเพื่อเลี้ยงต่อในรอบถัดไปจนครบสิบรอบ เมื่อสกัดพลาสมิดที่ได้หลังจากเลี้ยงครบในแต่ละรอบด้วยวิธี alkaline lysis และตรวจวิเคราะห์ขนาดพลาสมิดด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พลาสมิด pCF17_7 และ pCF17_8 ยังคงเกิดโรคได้กับมะละกอที่ทดสอบ


**คำสำคัญ**: ความเสถียรของพลาสมิด, โคลนก่อโรค, โพทีไวรัส, ไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ

## บทนำ

การสร้าง infectious clone ของไวรัสพืชและไวรัสสัตว์ จาก cDNA เต็มสายของเชื้อไวรัสที่มีจีโนมชนิดอาร์เอ็นเอ (RNA virus) เป็นขั้นตอนที่สำคัญ ในการนำไปใช้ศึกษาค้นคว้าพื้นฐานพันธุศาสตร์โมเลกุลของเชื้อไวรัส ที่จะทราบถึงหน้าที่ของยีนต่าง ๆ และลักษณะทางชีววิทยาของเชื้อไวรัส เช่น การเพิ่มปริมาณไวรัส ชนิดของพืชอาศัย ความรุนแรงในการเกิดโรค และแง่มุมด้านความสามารถในการก่อโรค เช่น การพัฒนาอาการโรค การเคลื่อนที่ระหว่างเซลล์และระยะไกลออกไปในต้นพืช การถ่ายทอดโรคผ่านเมล็ดและแมลงพาหะ ปฏิกิริยากับยีนที่ต้านทานโรค คุณสมบัติและชนิดของเอ็นไซม์จากเชื้อไวรัสในการย่อยโปรตีนและการถอดเปลือก (Tsai and Dreher, 1991; Atreya *et al.*, 1992; De Jong and Ahlquist, 1992; Carrington *et al.*, 1993) และเพื่อที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคต่อไป ปัญหาโดยทั่วไปของพลาสมิดที่เป็น infectious clone ของไวรัส มักมีความไม่เสถียรและสูญเสียความสมบูรณ์ของพลาสมิดไปในระหว่างการเลี้ยงเพิ่มปริมาณในแบคทีเรียเจ้าบ้าน ทำให้เป็นอุปสรรคต่อการนำพลาสมิดไปใช้ประโยชน์ต่อ (Boyer and Haenni, 1994) ปัญหานี้มักเกิดขึ้นกับพลาสมิดที่มีชิ้นจีโนมของไวรัส ที่มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายบวก (+strand RNA) สอดแทรก ที่มีขนาดยาวมากกว่า 9,000 นิวคลีโอไทด์ เช่น ของโพทีไวรัส (*Potyvirus*) เมื่อใช้เลี้ยงเซลล์เจ้าบ้านที่บางอุณหภูมิ หรือบางสายพันธุ์ของเซลล์เจ้าบ้าน เป็นต้น และมีรายงานว่าเป็นปัญหากับพลาสมิด infectious clone ของไวรัส PRSV–P สายพันธุ์ไทย (Charoensilp, 2000) และของ PRSV–W (Attasart, 2003; Chiampiriyakul, 2007) สายพันธุ์ไทย

ไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ (PRSV–P) จัดอยู่ในสกุลโพทีไวรัส (Potyvirus) ในวงศ์ Potyviridae เป็นไวรัสพืชที่สร้างความเสียหายอย่างรุนแรงกับแหล่งการผลิตมะละกอ (*Carica papaya* L.) ทั่วโลก

PRSV–P มีจีโนมแบบ monopartite ประกอบด้วยอาร์เอ็นเอสายบวก หนึ่งสาย ถ่ายทอดโรคได้ด้วยวิธีกลและแมลงพาหะในวงศ์ Aphididae ได้แก่ เพลี้ยอ่อนหลายชนิดในแบบ non–persistent แบ่งตามกลุ่มความเฉพาะพืชอาศัย ได้แก่ ชนิดพี (PRSV–P) ทำให้เกิดโรคได้ทั้งกับมะละกอและพืชตระกูลแตง ส่วนชนิดดับเบิ้ลยู (PRSV–W) ทำให้เกิดโรคกับพืชตระกูลแตงเท่านั้น จีโนมของไวรัส PRSV มีโปรตีน genome–linked protein (VPg) ติดอยู่ที่ปลาย 5´ และมีสาย poly(A) อยู่ที่ปลาย 3´ แปลรหัสได้เป็นโปรตีนสายเดียวขนาดใหญ่ แล้วย่อยตัวเองเป็นโปรตีนขนาดเล็กจำนวน 10 ชนิด เรียงลำดับเริ่มจากปลาย 5´ ของจีโนม ได้แก่ P1, HC–Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, NIa–VPg, NIa–Pro, NIb และโปรตีนห่อหุ้มไวรัส (CP) (Gonsalves *et al.,* 2010)

การสร้าง infectious clone ของโพทีไวรัสมีทั้งชนิดที่ถอดรหัสในหลอดทดลอง (*in vitro* RNA transcripts) โดยถอดรหัสจากโคลน cDNA สายเต็มที่ใช้โปรโมเตอร์ของ bacteriophage เช่น SP6 T7 และ T3 และทำให้เกิดโรคในพืชอาศัยได้ กับการสร้างโคลนในพลาสมิดที่ทำให้พืชเกิดโรคได้โดยตรง (*in vivo* RNA transcripts) ด้วยการโคลน cDNA สายเต็มภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S promoter (35S P) และประกอบด้วยส่วนท้าย poly(A) ต่อจาก 3´ UTR และ CaMV 35S terminator (35S T) หรือ NOS terminator เมื่อนำเข้าสู่พืชอาศัยทำให้เกิดโรคโดยตรงได้ (Johansen, 1996; Desbiez *et al.*, 2012) มีการสร้างพลาสมิด infectious clone ของ cDNA เต็มสายของไวรัส PRSV–P และ PRSV–W สายพันธุ์ไทย (Charoensilp, 2000; Attasart, 2003; Chiampiriyakul, 2007) พลาสมิด pSA1155, pSA1164 และ pSA1273 ประกอบด้วย cDNA สายเต็มของ PRSV–W เชื่อมกับพลาสมิดโครงสร้าง pUC 19 ควบคุมโดยโปรโมเตอร์ CaMV 35S แบบ partially duplicated และ NOS terminator เมื่อนำเข้าสู่พืชโดยวิธี particle bombardment pSA1164 และ pSA1273 ทำให้เกิดโรคกับซูกินีได้ แต่ pSA1155 ไม่ทำให้เกิดโรคเมื่อปลูกเชื้อโดยวิธีกล

พลาสมิดดังกล่าวมีความเสถียรต่ำ (Attasart, 2003) Chiampiriyakul (2007) ได้สร้าง pDPCwPN7978 and pDPCwAN0178 ประกอบด้วย cDNA สายเต็มของ PRSV–W เชื่อมกับพลาสมิดโครงสร้าง pDrive (Fermentus, USA) ควบคุมโดยโปรโมเตอร์ CaMV 35S แบบ partially duplicated และ NOS terminator พบว่า พลาสมิดดังกล่าวไม่เสถียรไม่สามารถเพิ่มจำนวนในแบคทีเรียเจ้าบ้านได้

จุดประสงค์ของการศึกษานี้ต้องการประเมินความเสถียรของพลาสมิด pCF17_7 และ pCF17_8 ที่เป็น *in vivo* infectious clone ของไวรัส PRSV–SMK5 สายพันธุ์ไทย ที่ได้สร้างขึ้น หลังผ่านการย้ายเลี้ยงเพิ่มปริมาณในแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* DH5–α เพื่อการนำไปใช้ในการศึกษาวิจัยถึงพันธุศาสตร์โมเลกุลของเชื้อไวรัสนี้ต่อไป

## อุปกรณ์ และวิธีการ

### การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

สุ่มโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5–α ที่มีพลาสมิด pCF17_7 หรือ pCF17_8 ขนาด 14.014 กิโลเบส (kb) (Figure 1) ที่เป็น *in vivo* infectious clone ของโคลน cDNA เต็มสายของจีโนมเชื้อ PRSV–SMK5 ที่มีความยาวของจีโนม 10,358 นิวคลีโอไทด์ (nts) รวมส่วนปลาย 3´poly(A) จำนวน 35 nts มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 10,032 nts ที่ถอดรหัสได้เป็น polyprotein ประกอบด้วย 3,343 กรดอะมิโน และส่วนไม่ถอดรหัสที่ปลาย 5´ จำนวน 85 nts และที่ปลาย 3´ จำนวน 206 nts พลาสมิดทั้งสองโคลนทำให้มะละกอเกิดอาการโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ (Assawathep, 2016) และพลาสมิดพาหะ pCass2 ขนาด 3.633 kb (Shi *et al.*, 1997) จากแต่ละตัวอย่างจำนวนสิบโคโลนี มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB+Amp (Luria–Bertani medium +

ampicillin 100 µg/ml) ปริมาตร 5 ml โดยเลี้ยงเขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับเป็นการเลี้ยงเชื้อรอบที่ 0 แล้วดูดเชื้อแบคทีเรียย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB+Amp หลอดใหม่ในอัตรา inoculum: medium 1:100 (V/V) เลี้ยงเขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับเป็นการเลี้ยงเชื้อรอบที่ 1 จากนั้นทำการย้ายเลี้ยงเชื้อต่อ ๆ กันข้างต้นจำนวนสิบรอบ (passage) และนำสารแขวนลอยเชื้อจากการเลี้ยงเชื้อแต่ละรอบ มาสกัดพลาสมิด เพื่อตรวจความเสถียรของพลาสมิดและการเกิดโรคกับต้นกล้ามะละกอ

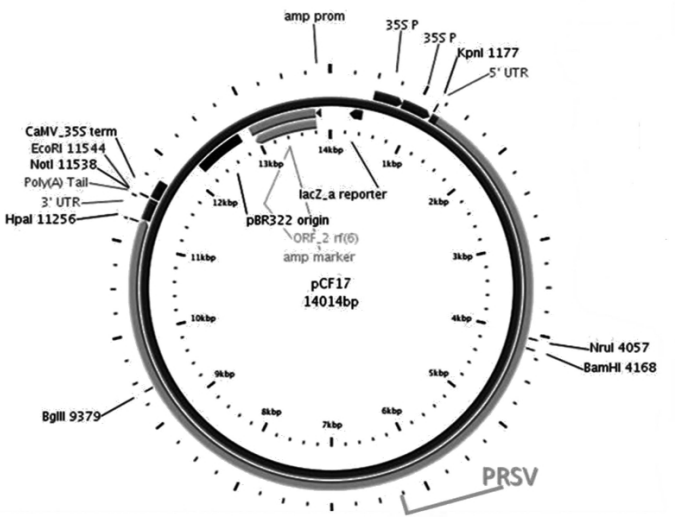


**Figure 1** The *in vivo* infectious construct, clone pCF17, derived from a full–length cDNA of PRSV–SMK combined on plasmid vector backbone (pCass2) under the control of a partially duplicated *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S promoter (35S P) and CaMV 35S terminator (CaMV_35S term)

**การสกัดและตรวจวิเคราะห์พลาสมิด**

นำเชื้อแบคทีเรียที่มีพลาสมิดจากที่เลี้ยงไว้ข้างต้น ปั่นตกเพื่อเก็บตะกอนเซลล์ด้วยความเร็ว 6,000g เป็นเวลา 2 นาที นำตะกอนเซลล์มาการสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis โดยใช้วิธีที่ปรับปรุงจาก Kotchoni *et al.* (2003) ซึ่งเปลี่ยนแปลงสารละลายของ solution III เป็น 8M ammonium acetate ละลายตะกอนพลาสมิดด้วย TE บัฟเฟอร์ (10 mM Tris–HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 20 µl

วิเคราะห์พลาสมิดที่สกัดได้ด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 0.8 % ใน 0.5 เท่า TBE บัฟเฟอร์ (45 mM Tris–HCl, 45 mM Boric acid, 25 mM EDTA, pH 8.0) ใช้กระแสไฟฟ้าตรงที่ความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที แล้วนำแผ่น agarose gel มาย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย ethidium bromide ความเข้มข้น 2 µg/ml เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาล้างโดยแช่น้ำเป็นเวลา 10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และถ่ายภาพด้วยเครื่อง gel documentation system (Gene Flash, Syngene Bio Imaging, Cambridge, UK)

**การทดสอบการเกิดโรค**

นำพลาสมิด pCF17_7 และ pCF17_8 และพลาสมิด pCass2 (พลาสมิดโครงสร้าง) ที่สกัดจากวิธีการข้างต้นมาตรวจวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง UV–Vis

spectrophotometer (NanoDrop 8000, Thermo Scientific, USA) นำไปปลูกเชื้อด้วยวิธีกลบนใบต้นมะละกอ โดยทำให้เกิดแผลด้วยผงคาร์บอรันดัม ปลูกเชื้อด้วยการทาพลาสมิดแต่ละชนิด อย่างละ 40 μg/ต้น ลงบนมะละกอที่มีใบจริงอย่างน้อยห้าใบ จำนวน 10 ต้น/กรรมวิธี ใช้โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 M (1M $K_2HPO_4$ 61.5 ml และ 1M $KH_2PO_4$ 38.5 ml, pH 7.0) ที่มี 0.5% (w/v) $Na_2SO_3$ และ 0.5% (w/v) คาร์บอรันดัม เป็นกรรมวิธีควบคุม และน้ำคั้นจากต้นมะละกอที่เป็นโรคจากเชื้อ PRSV–SMK5 เจือจาง 1:10 ในโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 M เป็นกรรมวิธีควบคุมบวก ทิ้งไว้นานสิบนาทีแล้วล้างด้วยน้ำ ปลูกมะละกอไว้ในโรงเรือนปลูกพืชป้องกันแมลงหลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ตรวจสอบอาการของโรคใบด่างจุดวงแหวน และนำใบมะละกอมาตรวจไวรัส PRSV ด้วยวิธี ELISA (Assawathep, 2016)

## ผลการทดลอง และวิจารณ์

ความเสถียรของ infectious clone ของ cDNA เต็มสายของไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ จากการวิเคราะห์ขนาดของพลาสมิด pCF17_7 และ pCF17_8 ที่สกัดได้จากแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* DH5–α พบว่าพลาสมิดทั้งสองยังคงมีขนาดเต็มสาย (14.014 kb) ทุกโคลนหลังผ่านการเลี้ยงโดยย้ายเชื้อจำนวนสิบรอบ (passage) ดังแสดงใน Figure 2B และ Figure 2C ตามลำดับ โดยพบพลาสมิดสายเต็มอยู่ในแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* DH5–α ที่สุ่มมาตรวจทุกโคลนในแต่ละชนิดที่ตำแหน่งเหนือขนาดแถบดีเอ็นเอมาตรฐานแถบแรก (λ/*Hin*dIII) เนื่องจากเป็นการแยกพลาสมิดแบบ native form ไม่ได้มีการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อให้เกิดเป็นแถบดีเอ็นเอ ในบางโคลนพบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งอื่นมีขนาดเล็กกว่า 14 kb ที่คาดว่าเป็นโคลนย่อยของ pCF17_7 และ pCF17_8 ที่พลาสมิดบางส่วนอาจเกิดการแตกหักจากกระบวนการสกัดพลาสมิด หรือรูปแบบ (form) ของพลาสมิดที่มีหลายแบบ เนื่องจากพลาสมิดมีขนาดใหญ่กระบวนการสกัดเพื่อให้ได้ native form ทำได้ยากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับพลาสมิดโครงสร้าง pCass2 (Figure 2A) ซึ่งพบแถบดีเอ็นเอหลายแถบเช่นกัน แสดงให้เห็นว่าพลาสมิด pCF17_7 และ pCF17_8 มีความเสถียรสูง เมื่อนำพลาสมิดไปปลูกเชื้อพบว่าพลาสมิด pCF17_7 และ pCF17_8 ทำให้เกิดโรคใบด่างจุดวงแหวนกับมะละกอได้

มีรายงานถึงความไม่เสถียรของพลาสมิด infectious clone ของเชื้อโพทีไวรัส ที่พบเมื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดในแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* บางโคลนโดยไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ ซึ่งอาจเกิดความเป็นพิษของโปรตีน P3 และ CI ของโพทีไวรัส (Jakab *et al.*, 1997) หรือจากการหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนที่เกิดขึ้น (Flasinski *et al.*, 1996) สอดคล้องกับรายงานการสร้างพลาสมิดที่เป็นโคลนของ cDNA เต็มสายของไวรัส PRSV–P สายพันธุ์ไทย ที่ใช้โปรโมเตอร์ CaMV 35S ที่มีบางส่วนของโปรโมเตอร์เป็นส่วนที่ซ้ำกัน (duplicate) ในการควบคุมการถอดรหัสดีเอ็นเอ พบว่าพลาสมิดไม่มีความเสถียร และผลผลิตของพลาสมิดที่สกัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียที่มีโคลนเหล่านี้นั้นต่ำมาก (Charoensilp, 2000) การสร้างพลาสมิดที่เป็นโคลนของ cDNA สายเต็มของอาร์เอ็นเอของไวรัส PRSV–W สายพันธุ์ไทย ที่ใช้โปรโมเตอร์ T7 polymerase พบว่าไม่เสถียร เมื่อเก็บเชื้อ *E. coli* DH5–α เจ้าบ้านที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลาหลายวันแล้วนำมาเลี้ยงใหม่ พบว่า มีรูปแบบของแถบ cDNA เปลี่ยนไปเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Attasart, 2003; Chiampiriyakul, 2007) โคลน cDNA เต็มสายของไวรัส PRSV–W ที่ควบคุมการแสดงออกของยีนด้วยการควบคุมของโปรโมเตอร์ CaMV 35S และ T7 RNA polymerase promoter ไม่สามารถเพิ่มทวีได้ในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งคาดว่าเกิดความเป็นพิษของโปรตีนไวรัสกับเชื้อ *E. coli* เจ้าบ้าน ส่งผลให้เกิดการหายไปของพลาสมิดระหว่างการเพิ่มปริมาณของพลาสมิด

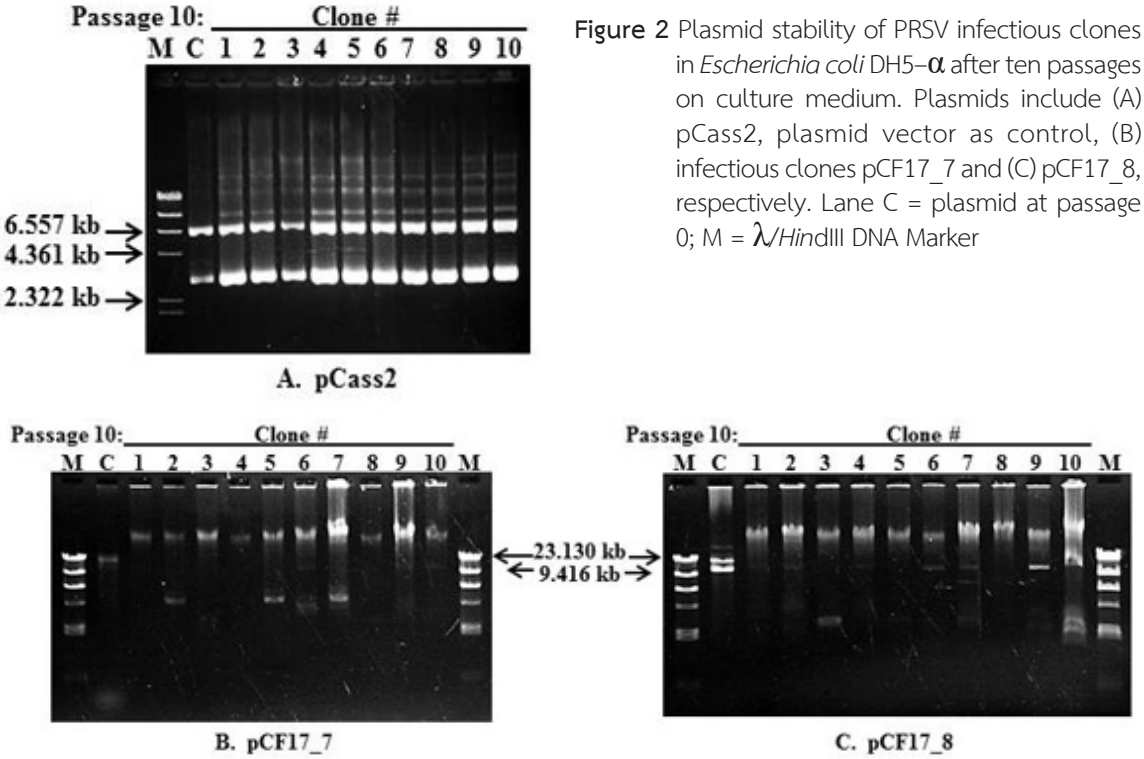


**Figure 2** Plasmid stability of PRSV infectious clones in *Escherichia coli* DH5–α after ten passages on culture medium. Plasmids include (A) pCass2, plasmid vector as control, (B) infectious clones pCF17_7 and (C) pCF17_8, respectively. Lane C = plasmid at passage 0; M = λ/*Hin*dIII DNA Marker

(Chiampiriyakul, 2007) มีการทดสอบเพิ่มความเสถียรของ cDNA โคลนของจีโนมโพทีไวรัส ในหลายวิธี เช่น การสอดแทรก intron เข้าบริเวณส่วน cDNA ของไวรัสตำแหน่งยีนที่คาดว่าเป็นพิษได้ มีในรายงานของไวรัสหลายชนิดในโพทีไวรัส ได้แก่ *Pea seedborne mosaic virus* (Johansen, 1996) *Plum pox virus* (Lopez–Moya and Garcia, 2000) และ *Papaya leaf distortion mosaic* (Tuo *et al.*, 2015) เป็นต้น แต่มีหลายรายงานที่ประสบความสำเร็จในการสร้าง infectious clone ของไวรัส PRSV ทั้งแบบ *in vitro* หรือ *in vivo* ที่ไม่มีการสอดแทรก intron ทำให้คาดได้ว่าโคลนที่จะเป็น infectious clone ของไวรัส PRSV ไม่จำเป็นต้องแทรกส่วนของ intron ก็ได้ (Chiang and Yeh, 1997; Chen *et al.*, 2008) ซึ่งสอดคล้องกับการสร้างโคลนที่เป็น infectious clone ของไวรัส PRSV ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ (Assawathep, 2016) ที่โคลนไม่มีการแทรกส่วน intron เข้าไปแต่อย่างใด ประกอบกับพลาสมิดโครงสร้างที่ใช้ pCass2 เป็นพลาสมิดที่มีส่วนเริ่มต้นการเพิ่มจำนวน (origin of replication) ที่มาจากพลาสมิด pBR322 (pBR322 ori) ที่เพิ่มปริมาณที่ต่ำต่อเซลล์ (20 copies/cell) ซึ่งต่างจากพลาสมิดที่มีโครงสร้างจากพลาสมิด pUC ที่จะเพิ่มปริมาณต่อเซลล์สูงถึง 500 copies/cell (Howe, 2007) ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดปัญหาของความไม่เสถียรของโคลน cDNA ที่มีขนาดยาวกว่า 9,000 นิวคลีโอไทด์ (Boyer and Haenni, 1994)

## สรุป

ในการทดสอบกับพลาสมิด *in vivo* infectious clone ของ cDNA เต็มสายของไวรัส PRSV–SMK5 จำนวนสองโคลน ได้แก่ pCF17_7 และ pCF17_8 ที่ใช้พลาสมิดโครงสร้าง pCass2 ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณในแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* DH5–α ในอาหารเหลว

Luria–Bertani ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 µg/ml เขย่าที่ความเร็วคงที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังการย้ายเชื้อต่อเนื่องกันจำนวนสิบรอบ พลาสมิดมีความเสถียรและเกิดโรคกับมะละกอที่ปลูกเชื้อด้วยพลาสมิดได้

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140 จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900 และได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทบัณฑิตศึกษา จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปี 2558 ที่มอบให้กับ ชุติรัตน์ อัศวเทพ และขอบคุณ ดร.ปาริชาติ เบิร์นส ที่ให้คำแนะนำและสนับสนุน pCass2 ในการวิจัยนี้

## เอกสารอ้างอิง

Assawathep, C. 2016. Construction of *in vivo* Full–Length Transcripts of a *Papaya Ringspot Virus* Type P (PRSV–P) Thai Strain. Ph.D. Thesis, Kasetsart University, Bangkok.(in Thai)

Atreya, C.D, P.L. Atreya, D.W. Thornbury and T.P. Pirone. 1992. Site–directed mutations in the Potyvirus HC–Pro gene affect helper component activity, virus accumulation, and symptom expression in infected tobacco plants. Virology. 191: 106–111.

Attasart, P. 2003. Genome Characterization and Construction of *Papaya Ringspot Virus* Type W (PRSV–W) Infectious Transcript. Ph.D. Thesis, Mahidol University, Bangkok.

Boyer, J.C. and A.L. Haenni. 1994. Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. Virology. 198: 415–426.

Carrington, J.C., R. Haldeman, V.V. Dolja and M.A. Restrepo–Hartwig. 1993. Internal cleavage and trans–proteolytic activities of the VPg proteinase (NIa) of *Tobacco etch potyvirus in vivo*. J. Virol. 67: 6995–7000.

Charoensilp, G. 2000. Construction of Full–Length ***Papaya Ringspot*** *Virus* Type P Thai Strain Cassettes for *in vivo* Transcripts and Production in Papaya Plant. MS Thesis, Mahidol University, Bangkok. (in Thai)

Chen, K.C., C.H. Chiang, J.A. Raja, F.L. Liu, C.H. Tai and S.D. Yeh. 2008. A single amino acid of NIaPro of *Papaya ringspot virus* determines host specificity for infection of papaya. Mol. Plant–Microbe Interact. 21: 1046–1057.

Chiampiriyakul, P. 2007. Construction of an Infectious Full–Length cDNA Clone of a *Papaya Ringspot Virus* Type W. Ph.D. Thesis, Kasetsart University, Bangkok.

Chiang, C.H. and S.D. Yeh. 1997. Infectivity assays of *in vitro* and *in vivo* transcripts of *Papaya ringspot potyvirus*. Bot. Bull. Acad. Sinica. 38: 153–163.

De Jong, W. and P. Ahlquist. 1992. A hybrid plant RNA virus made by transferring the noncapsid movement protein from a rod–shaped to an icosahedral virus is competent for systemic infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6808–6812.

Desbiez, C., C. Chandeysson, H. Lecoq and B. Mourey. 2012. A simple, rapid and efficient way to obtain infectious clones of potyviruses. J. Virol. Methods. 183: 94–97.

Flasinski, S., U.B. Gunasinghe, R.A. Gonzales and B.G. Cassidy. 1996. The cDNA sequence and infectious transcripts of *Peanut stripe virus*. Gene. 171: 299–300.

Gonsalves, D., S. Tripathi, J.B. Carr and J.Y. Suzuki. 2010. *Papaya ringspot virus*. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI–I–2010–1004–01.

Howe, C. 2007. Gene Cloning and Manipulation. Cambridge University Press, USA.

Jakab, G., E. Droz, G. Brigneti, D. Baulcombe and P. Malnoe. 1997. Infectious *in vivo* and *in vitro* transcripts from a full–length cDNA clone of PVY–N605, a Swiss necrotic isolate of *Potato virus Y*. J. Gen. Virol. 78: 3141–3145.

Johansen, I.E. 1996. Intron insertion facilitates amplification of cloned virus cDNA in *Escherichia coli* while biological activity is reestablished after transcription *in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 12400–12405.

Kotchoni, S.O., E.W. Gachomo, E. Betiku and O.O. Shonukan. 2003. A home made kit for plasmid DNA mini–preparation. Afr. J. Biotechnol. 2: 88–90.

Lopez–Moya, J.J. and J.A. Garcia. 2000. Construction of a stable and highly infectious intron–containing cDNA clone of *Plum pox potyvirus* and its use to infect plants by particle bombardment. Virus Res. 68: 99–107.

Shi, B.J., S.W. Ding and R.H. Symons. 1997. Plasmid vector for cloning infectious cDNAs from plant RNA viruses: High infectivity of cDNA clones of *Tomato aspermy cucumovirus*. J. Gen. Virol. 78: 1181–1185.

Tsai, C.H. and T.W. Dreher. 1991. *Turnip yellow mosaic virus* RNAs with anticodon loop substitutions that result in decreased valylation fail to replicate efficiently. J. Virol. 65: 3060–3067.

Tuo, D., W. Shen, P. Yan, X. Li and P. Zhou. 2015. Rapid construction of stable infectious full–length cDNA clone of *Papaya leaf distortion mosaic virus* using in–fusion cloning. Viruses. 7: 6241–6250.