

## การสังเคราะห์ *in vivo* Transcript จากโคลน cDNA เต็มสายของเชื้อไวรัสใบต่างจุด วงแหวนมะละกอ (PRSV-P) สายพันธุ์ไทย

### Synthesis of *in vivo* Full-Length Transcripts cDNA of *Papaya Ringspot Virus* (PRSV-P) Thai Strain

ชุตีรัตน์ อัสวเทพ<sup>1,2</sup> จุฑาทเป วัชรไชยคุปต์<sup>1,2</sup> สุจินต์ ภัทรภูวadol<sup>1,2,3</sup> และ วิชัย โฆสิตรัตน์<sup>1,2,3,\*</sup>  
Chutirat Assawathep<sup>1,2</sup>, Jutatape Watcharachaiyakup<sup>1,2</sup>, Sujin Patarapuwadol<sup>1,2,3</sup>  
and Wichai Kositratana<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup> ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

<sup>2</sup> ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

<sup>3</sup> ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

<sup>1</sup> Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

<sup>2</sup> 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

<sup>3</sup> 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:** A whole genome of *Papaya ringspot virus* (PRSV-P) Thai strain was cloned. Seven complementary DNAs (cDNAs) of subgenomic fragments encompassed the whole genome of PRSV-SMK5 isolate. The PRSV-SMK5 genome was synthesized by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) using primers designed from unique sites of restriction enzymes in the genome. The sizes of the PCR products ranged from 493 to 2,706 nucleotides (nts). Each fragment was cloned into the pGEM<sup>®</sup>-T easy plasmid vector to verify the sequence. The confirmed plasmids were used as templates for overlapping PCR and sequentially cloned into pCass2 plant expression vector. The transcription of PRSV genome was driven by *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S promoter and terminated by CaMV terminator. Two full-length cDNA clones of PRSV-SMK5 isolate, which were designated as pCF17\_7 and pCF17\_8, were obtained. Each clone showed 10,358 nts in length with 35 nts of an artificial poly(A) tail and containing both 5' and 3' non-coding regions consisting of 85 and 206 nts, respectively. A polyprotein of 3,343 deduced amino acids was encoded from 10,032 nts. Both plasmids, pCF17\_7 and pCF17\_8, were infectious and showed the PRSV typical symptoms at 21 days after mechanical inoculation on papaya seedlings. The *in vivo* transcribed RNAs in the plant sap were confirmed by RT-PCR, serological detection of PRSV coat protein and PRSV particles were also observed under immuno electron microscopy.

**Keywords:** *Papaya ringspot virus*, *in vivo* full length transcript, infectious cDNA clone, *potyvirus*

## บทคัดย่อ

โคลนจีโนมเต็มสายของเชื้อไวรัสใบต่างจุดวงแหวนมะละกอ (*Papaya Ringspot Virus* (PRSV-P) สายพันธุ์ไทย โดยการสังเคราะห์ cDNA ของเชื้อไวรัส PRSV-SMK5 ด้วยปฏิกิริยา reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) ของจีโนมเป็นส่วน ๆ จำนวน 7 ชิ้นย่อย มีความยาวตั้งแต่ 493 ถึง 2,706 นิวคลีโอไทด์ (nts) โดยกำหนดให้แต่ละชิ้นซ้อนเหลื่อมกันทั้งจีโนม ด้วยการใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีเพียงหนึ่งตำแหน่งบนจีโนม นำแต่ละชิ้นย่อยโคลนเข้าพลาสมิด pGEM®-T easy เพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ และเป็นแหล่งสังเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อโคลนเข้าพลาสมิด pCass2 ซึ่งมีการขับเคลื่อนการถอดรหัสของยีน (transcription) ด้วยชุดโปรโมเตอร์ *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S จำนวนสองชุดต่อเนื่องกัน และหยุดการถอดรหัสด้วย CaMV 35S terminator โดยการโคลนนิ่งแบบต่อเนื่องเป็นลำดับ ด้วยเทคนิค overlap extension PCR cloning ได้โคลน cDNA เต็มสายของจีโนมเชื้อ PRSV-SMK5 จำนวนสองพลาสมิดให้ชื่อว่า pCF17\_7 และ pCF17\_8 ที่มีความยาวของจีโนม ซึ่งรวม 35 nts ของส่วน poly(A) ยาว 10,358 nts เท่ากัน ประกอบด้วยส่วนไม่ถอดรหัสที่ปลาย 5' จำนวน 85 nts และที่ปลาย 3' จำนวน 206 nts มีลำดับ นิวคลีโอไทด์ 10,032 nts ที่ถอดรหัสได้เป็น polyprotein ประกอบด้วย 3,343 กรดอะมิโน พลาสมิดทั้งสองโคลนทำให้มะละกอเกิดอาการโรคใบต่างจุดวงแหวนมะละกอ หลังการปลูกเชื้อด้วยพลาสมิดเป็นเวลา 21 วัน ตรวจยืนยันพบสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR และโปรตีนห่อหุ้มของเชื้อ PRSV ด้วยเทคนิค ELISA และตรวจพบอนุภาคของเชื้อ PRSV ด้วยเทคนิค immuno electron microscopy

**คำสำคัญ:** ไวรัสใบต่างจุดวงแหวนมะละกอ, *in vivo*

full length transcript, infectious cDNA clone, *potyvirus*

## บทนำ

ไวรัสใบต่างจุดวงแหวนมะละกอ (*Papaya ringspot virus*; PRSV) เป็นเชื้อไวรัสจัดอยู่ในสกุล *Potyvirus* ในวงศ์ *Potyviridae* ซึ่งมีอนุภาคเป็นพออนยาวคดขนาด 760–800 นาโนเมตร x 12 นาโนเมตร มีจีโนมแบบ monopartite ประกอบด้วยอาร์เอ็นเอสายบวก สายเดียวยาวประมาณ 10,326 นิวคลีโอไทด์ (nts) และมีสาย poly(A) ที่ปลายสาย (Purcifull *et al.*, 1984; Yeh *et al.*, 1992) ถ่ายทอดโรคด้วยวิธีกลและด้วยเพลี้ยอ่อนหลายชนิดในแบบ non-persistent ทำให้เกิดอาการใบต่างในมะละกอ ใบอาจเรียวกเล็กลดรูปอย่างมาก ผิวผลขรุขระเกิดรอยแผลวงแหวนฉ่ำน้ำ ชีตผลฉ่ำน้ำที่ส่วนของลำต้นและก้านใบ การเจริญเติบโตจะชะงัก ดอกร่วง ทำให้ติดผลน้อย เชื้อ PRSV จัดแบ่งออกเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่ม PRSV-P เกิดโรคได้ทั้งมะละกอและพืชตระกูลแตง และกลุ่ม PRSV-W ที่เกิดโรคได้เฉพาะกับพืชพวกแตงเท่านั้น (Gonsalves and Ishii, 1980) และเชื้อ PRSV ทำให้เกิดแผลจุดเฉพาะแห่ง (local lesion) กับพืชวงศ์ *Chenopodiaceae* (Conover, 1964) จีโนมของเชื้อมี genome-linked protein (VPg) ติดอยู่ที่ปลาย 5' และมีสาย poly(A) อยู่ที่ปลาย 3' ถอดรหัสได้โปรตีนขนาดใหญ่ขึ้นเดียว ซึ่งจะย่อยตัวเองออกเป็นโปรตีนจำนวน 10 ชนิดคือ โปรตีน P1 เอนไซม์ helper component-proteinase (HC-Pro) โปรตีน P3 โปรตีน 6K1 โปรตีน cylindrical inclusion (CI) โปรตีน 6K2 โปรตีน VPg (NIa-Vpg) เอนไซม์ nuclear inclusion a proteinase (NIa-Pro) โปรตีน large nuclear inclusion (Nib) และโปรตีนห่อหุ้มไวรัส (CP) (Yeh *et al.*, 1992)

การสร้างพลาสมิดที่มีคุณสมบัติทำให้เกิดโรคได้ (infectious cDNA clone) ของเชื้อไวรัสที่มีจีโนมเป็น

อาร์เอ็นเอ เป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญ ซึ่งจะนำไปสู่ความรู้ และเข้าใจถึงพันธุกรรมของเชื้อไวรัสและนำไปใช้ในการควบคุมเชื้อไวรัสได้ ปัจจุบันมีรายงานถึงการสร้าง infectious cDNA clone ของเชื้อ *Potyvirus* ทั้งที่เป็น *in vitro* และ *in vivo* infectious cDNA clone ไม่น้อยกว่า 20 ชนิด (Tuo *et al.*, 2015) รวมทั้งเชื้อ PRSV (Chiang and Yeh, 1997) แม้ว่าการพัฒนาเทคนิคด้านชีวโมเลกุลได้รุดหน้าไปอย่างรวดเร็ว แต่การสร้างพลาสมิดสายเต็มจีโนมของไวรัสที่สามารถทำให้เกิดโรคได้ ยังเป็นขั้นตอนที่มีความละเอียดอ่อน มีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลากหลาย จึงมีห้องปฏิบัติการไวรัสจำนวนไม่มากนักที่ประสบผลสำเร็จ ซึ่งในการศึกษานี้ได้ประสบความสำเร็จในการโคลนจีโนมเต็มสายของเชื้อ PRSV-P และสร้างโคลนที่สามารถถอดรหัสภายในเซลล์พืชอาศัย และทำให้เกิดโรคได้ (*in vivo* infectious clone)

## อุปกรณ์ และวิธีการ

### แหล่งเชื้อไวรัส PRSV และการตรวจริยพันธุ์เชื้อ

นำเชื้อ PRSV-SMK ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.ศรีเมฆ ชาวโพพาง ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มาแยกให้บริสุทธิ์โดยปลูกเชื้อลงบนใบ *Chenopodium quinoa* ซึ่งจะเกิดแผลจุดเฉพาะแห่ง (local lesion) นำแต่ละจุดมาเพิ่มปริมาณเชื้อด้วยการปลูกเชื้อด้วยวิธีกลบนใบมะละกอ (*Carica papaya* L.) และแตงหนาม (*Cucumis metuliferus* cv. Accession 2459) สังเกตอาการของโรคเป็นเวลาสองสัปดาห์

ตรวจสอบยืนยันเชื้อ PRSV จากการทำปฏิกิริยา PCR ที่จำเพาะต่อยีน CP (Chokboon, 2011) และส่วน 5' untranslated region (UTR) และเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับจีโนมเชื้อ PRSV-SMK ที่รายงานไว้ก่อนหน้า (Chokboon, 2011) โดยการนำแต่ละต้นที่ปลูกเชื้อสกัดอาร์เอ็นเอด้วย Thermo Scientific™ GeneJET™ Plant RNA Purification Mini Kit

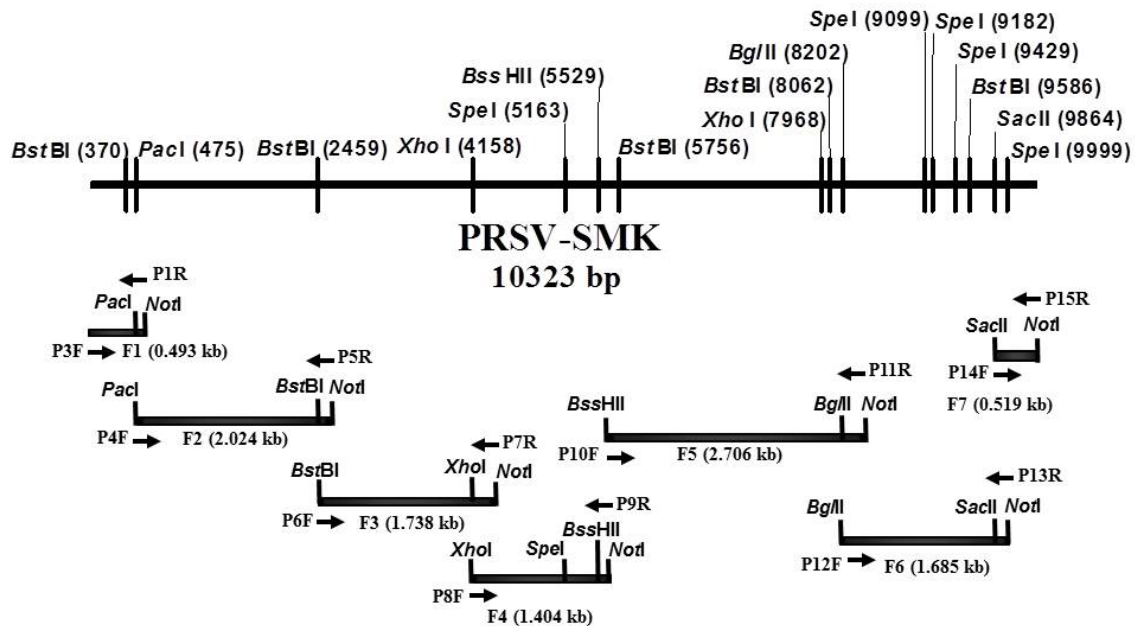
(Thermo Scientific, USA) สังเคราะห์ cDNA ด้วย RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA) โดยใช้ไพรเมอร์ oligo(dT)<sub>18</sub> แล้วนำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction) โดยใช้ไพรเมอร์ SC501F และ SC104R สำหรับตรวจวิเคราะห์ยีน CP และไพรเมอร์ P3F และ MPSMK475R สำหรับส่วน 5' UTR (Table 1) ซึ่งมีองค์ประกอบปฏิกิริยาดังนี้ cDNA ต้นแบบของแต่ละไอโซเลท เจือจาง 50 เท่า จำนวน 2 ไมโครลิตร, 1X GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA), ไพรเมอร์ชนิดละ 10 pmol ในปฏิกิริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตร และรอบปฏิกิริยาดังนี้ Predenature 94°C เป็นเวลา 5 นาที, denature 94°C เป็นเวลา 1 นาที, annealing 50°C เป็นเวลา 30 วินาที extension 72°C เป็นเวลา 1 นาที ทำขั้นตอน denature – extension จำนวน 30 รอบ และ final extension ที่ 72°C เป็นเวลา 7 นาที นำผลผลิตพีซีอาร์โคลนเข้า pGEM®-T easy vector (Promega, USA) ถ่ายเข้าแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5-alpha ด้วยเทคนิค heat shock (Sambrook *et al.*, 1989) คัดเลือกโคลนด้วยเทคนิค blue-white colony screening ตรวจสอบโคลนของแต่ละไอโซเลทด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยตรวจสอบยีน 5' UTR ดังรายละเอียดด้านบน

นำโคลนที่ผ่านการคัดเลือกของแต่ละไอโซเลท จำนวน 5 โคลน เลี้ยงเพิ่มปริมาณและสกัดพลาสมิดด้วย Presto™ Mini Plasmid Kit (Geneaid, USA) นำส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ First Base Laboratories ประเทศมาเลเซีย นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบความเหมือนของแต่ละไอโซเลท โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PRSV-SMK (Chokboon, 2011) ด้วย Clustal Omega program ของ European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) (Sievers *et al.*, 2011) เพื่อคัดเลือกไอโซเลทตัวแทนของเชื้อ PRSV-SMK ที่จะใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA ต่อไป

**การสังเคราะห์ cDNA และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ  
จีโนมของ PRSV-SMK**

นำไอโซเลทที่เลือกได้จากข้างต้น ใช้เป็นต้นแบบ

สำหรับการโคลนเพื่อสร้าง cDNA เต็มสายของจีโนม  
PRSV-SMK สังเคราะห์ดีเอ็นเอ 7 ชิ้นซึ่งครอบคลุมทั้ง  
จีโนม (Figure 1)



**Figure 1** A description and partial restriction map of the full-length DNA sequence of PRSV-SMK (Chokboon, 2011) for construction of *in vivo* infectious clone of PRSV-SMK5. The infectious clone, pCF17, was constructed by ligation all of fragments with suitable enzymes. The arrows indicate the positions of primers, which were used to amplify each fragment

ทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณแต่ละชิ้นส่วนของ  
จีโนม ซึ่งมีองค์ประกอบปฏิกิริยาดังนี้ cDNA  
ต้นแบบเจือจาง 50 เท่า จำนวน 2 ไมโครลิตร  
Phusion® Hot Start II High-fidelity DNA  
polymerase (Thermo Scientific, USA) 1 unit  
ไพรเมอร์ชนิดละ 20 pmol 200 µM dNTPs 1x  
Phusion® GC-PCR buffer ในปฏิกิริยาทั้งหมด 50  
ไมโครลิตร และรอบปฏิกิริยาดังนี้ Predenature  
98°C เป็นเวลา 30 วินาที denature 98°C เป็น

เวลา 10 วินาที annealing 62°C เป็นเวลา 30  
วินาที และ extension 72°C ตามขนาดความยาว  
ของแต่ละชิ้นย่อย (Table1) ทำขั้น denature -  
annealing จำนวน 30 รอบ และ final extension  
ที่ 72°C เป็นเวลา 10 นาที

โดยคู่ไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอตั้ง  
ต่อไปนี้ ใช้ P3F และ P1R สำหรับ F1 ใช้ P4F และ  
P5R สำหรับ F2 ใช้ P6F และ P7R สำหรับ F3 ใช้  
P8F และ P9R สำหรับ F4 ใช้ P10F และ P11R



Table 1 Continue

| Name <sup>1</sup>   | Sequence (5' to 3') <sup>2</sup>                                  | Primer Set    | Extension time of PCR (sec) |
|---------------------|---|---------------|-----------------------------|
| P17F <sup>5</sup>   | CTTCACGATGGCTGGTGGT   | -             | -                           |
| P18R <sup>5</sup>   | GATCTCCTTCTGCGCATTGA  | -             | -                           |
| P19F <sup>5</sup>   | CGTTCTGGAAAAGCTCAC  | -             | -                           |
| P20F <sup>5</sup>   | TGTACGCCGAAGTGTGTGTC  | -             | -                           |
| P21F <sup>5</sup>   | CACTTGACATTGAAGCCGTC  | -             | -                           |
| P22R <sup>5</sup>   | ACTGTTGCATTGT <u>GCGCGC</u> TTGCCTTACAGTGAATT<br>TTTGAGTAAGCTCAAC | -             | -                           |
| P23F <sup>5</sup>   | CAGTCGAACAAAGACGAGACC   | -             | -                           |
| P24F <sup>5</sup>   | GGAACATCCCCAGACATATCT   | -             | -                           |
| P25R <sup>C</sup>   | TAATTCCATAC <u>CCGCGG</u> CATGTACCTCTCAGTAGCATT<br>CCTCTTTGC      | P12F/P25R     | 55                          |
| SC501F <sup>D</sup> | AAAGTGGTATGAGGGAGTGAGGAA  | SC501F/SC104R | 60                          |
| SC104R <sup>D</sup> | ATTGCGCATACCTAGGAGAGAGTG  | SC501F/SC104R | 60                          |
| M13R <sup>5</sup>   | GCGGATAACAATTTACACAGG   | -             | -                           |

<sup>1</sup> F and R in the primer names indicate forward and reverse primers, respectively

<sup>2</sup> Underline sequences are restriction sites i.e. GGTAAC for *KpnI*, TTAATTAA for *PacI*, GCGGCCGC for *NotI*, GAATTC for *EcoRI*, TTCGAA for *BstBI*, CTCGAG for *XhoI*, GCGCGC for *BssHII*, AGATCT for *BglII* and CCGCGG for *SacII*. These sites were used for excision of the inserts to construct recombinant plasmids

<sup>C</sup> Primer was used in PCR using Phusion<sup>®</sup> Hot Start II High-fidelity DNA polymerase (Thermo Scientific, USA) for cloning

<sup>D</sup> Primer was used in PCR using GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix (Promega, USA) for PRSV CP gene detection.

<sup>5</sup> Primer was used for DNA sequencing

### การสร้างโคลน cDNA เต็มสายจากเชื้อ PRSV-SMK5

การโคลน cDNA เต็มสายของเชื้อ PRSV-SMK5 สร้างขึ้นได้จากการต่อชิ้นย่อยของจีโนม PRSV-SMK5 จำนวน 6 ชิ้น เข้าด้วยกัน ด้วยการโคลนแบบเป็นลำดับชั้นเรียงลำดับชิ้นย่อยจากปลาย 5' ถึงปลาย 3' ของจีโนม โดยการแทรกชิ้นย่อยของจีโนมแต่ละชิ้น (Figure 1) เข้าระหว่างตำแหน่งของเอนไซม์ในเวกเตอร์ที่มีเพียงตำแหน่งเดียวในจีโนม ด้วยการใส่เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันตัดทั้งเวกเตอร์และชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการแทรกแล้วต่อทั้งสองชิ้นเข้าด้วยกัน พลาสมิดที่สร้างขึ้นก่อนใช้เป็นเวกเตอร์สำหรับแทรกชิ้นย่อยของจีโนมชิ้น

ถัดไปต่อด้านปลาย 3' ของชิ้นย่อยของจีโนมชิ้นก่อนหน้า ใช้วิธีการเช่นนี้จนได้ cDNA เต็มสายครบ

การเตรียมแต่ละชิ้นย่อยของจีโนมได้มาจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เช่นเดียวกับการการสังเคราะห์ cDNA จากจีโนมของ PRSV-SMK หรือการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยตรงจากพลาสมิดสายผสม pGEM-F1 ถึง F7 และใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ FastDigest<sup>™</sup> (Thermo Scientific, USA) ตัดชิ้นดีเอ็นเอซึ่งขึ้นอยู่กับเอนไซม์ที่ปรากฏในแต่ละชิ้นย่อย ตรวจสอบดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis ทำชิ้นดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วยการ



ตัดแถบดีเอ็นเอออกจากเจลแล้วใช้ GenepHlow™ Gel/PCR Kit Protocol (Geneaid, USA) ทำปฏิกิริยาต่อชิ้นดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase (Promega, USA) การถ่ายพลาสมิดเข้าแบคทีเรีย การคัดเลือก ใช้วิธีเดียวกับการโคลนชิ้น F1 ถึง F7 และตรวจสอบโคลนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ที่ใช้ปฏิกิริยาเหมือนการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ หรือตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ คัดเลือกอย่างน้อย 3 โคลนนำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

รายละเอียดการสร้างแต่ละพลาสมิดมีวิธีการตามลำดับดังต่อไปนี้ 1.) pCF1 ขนาด 4.137 kb เกิดจากการแทรกผลผลิตพีซีอาร์ของ F1 ขนาด 0.511 kb ที่ใช้ pGEM-F1 เป็นต้นแบบ และใช้ไพรเมอร์ KpnI1F และ F1EcoRIR เข้าระหว่าง KpnI และ EcoRI ของพลาสมิดควบคุมการถอดรหัสในพืช pCass2 (Shi *et al.*, 1997) 2.) pCF13 ขนาด 7.828 kb เกิดจากการนำชิ้นผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 3.726 kb ที่ครอบคลุม F2 และ F3 ที่ใช้ cDNA ของ PRSV-SMK5 เป็นต้นแบบ และใช้ไพรเมอร์ P4F และ P7R แทรกเข้าระหว่าง PacI และ NotI ใน pCF1 3.) pCF14 ขนาด 9.195 kb เกิดจากการนำ F4 ที่เตรียมจากการตัดดีเอ็นเอจาก pGEM-F4 แล้วแทรกเข้าระหว่าง XhoI และ NotI ใน pCF13 4.) pCF15 ขนาด 11.872 kb เกิดจากการแทรกผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 4.081 kb เข้าระหว่าง SpeI และ NotI ใน pCF14 ผลผลิตพีซีอาร์ชิ้นนี้เตรียมได้จากเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ P8F และ P11R และใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้จากการตัดและต่อผลผลิตพีซีอาร์ของ F4 และ F5 ที่ตำแหน่งเอนไซม์ BssHIII โดยผลผลิตพีซีอาร์ของ F4 และ F5 เหล่านี้ ใช้ pGEM-F4 และ pGEM-F5 เป็นต้นแบบตามลำดับ 5.) pCF17 ขนาด 14.014 kb เกิดจากการนำผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 2.174 kb แทรกเข้าระหว่าง BglII และ NotI ใน pCF15 โดยเตรียมผลผลิตพีซีอาร์จากเทคนิค overlap extension PCR เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ P12F และ P15R และใช้ผลผลิตพีซีอาร์สองชิ้นเป็นดีเอ็นเอ

ต้นแบบประกอบด้วย ชิ้นแรกเตรียมจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ของ F6 ที่ใช้ pGEM-F6 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบใช้ไพรเมอร์ P12F และ P25R เพื่อเพิ่มส่วนที่ซ้อนเหลื่อมกันระหว่าง F6 กับ F7 จำนวน 23 nts และชิ้นที่สองเตรียมจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ของ F7 ที่ใช้ไพรเมอร์ P14F และ P15R และใช้ pGEM-F7 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบคัดเลือกโคลน cDNA เต็มสายของ PRSV-SMK5 ไปทดสอบความสามารถในการก่อโรคต่อไป

### การประเมินการทำให้เกิดโรคของ cDNA โคลนเต็มสายจาก PRSV-SMK5

สกัดพลาสมิด pCass2 (ตัวควบคุมลบ) และพลาสมิด pCF17\_7 และ pCF17\_8 ที่มี cDNA สายเต็มของไอโซเลท PRSV-SMK5 ด้วย QIAfilter™ Plasmid Purification Maxi Kit (Qiagen, USA) ปรับความเข้มข้นของ พลาสมิดเป็น 1 µg/µl ปลุกเชื้อด้วยพลาสมิดแต่ละชนิดๆ ละ 40 µg/ต้น จำนวน 10 ต้น/กรรมวิธี ใช้ฟอสเฟตบัพเฟอร์เป็นตัวควบคุมลบ และนำคั้นจากต้นมะละกอที่เป็นโรคจาก PRSV-SMK5 เป็นตัวควบคุมบวก ตรวจสอบอาการของโรค และหลังจากปลุกเชื้อเป็นเวลา 21 และ 28 วัน ตรวจสอบการถอดรหัส (transcription) ของโคลนด้วยการสกัดอาร์เอ็นเอจากใบมะละกอที่ปลุกเชื้อทุกต้น แล้วนำอาร์เอ็นเอที่ได้มาตรวจยีน CP โดยวิธี RT-PCR ดังวิธีข้างต้น ตรวจสอบการแปลรหัสของยีน CP จากใบมะละกอที่ได้รับการปลุกเชื้อทุกต้นด้วยเทคนิค Plate-trapped antigen indirect ELISA (PTA-indirect ELISA) (Clark and Adams, 1977) โดยใช้ rabbit polyclonal antibody ต่อโปรตีนห่อหุ้ม (CP) ของ PRSV และตรวจยืนยันการสร้างอนุภาคไวรัสโดยตรวจหาอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (TEM-1230, JEOL, Japan) โดยใช้เทคนิค immuno electron microscope (Chiang and Yeh, 1997)

## ผลการทดลอง และวิจารณ์

### การวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดโรคและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PRSV-SMK และไอโซเลทต่างๆของ PRSV-SMK

จากการปลูกเชื้อด้วยวิธีกลโดยใช้น้ำคั้นจากใบมะละกอที่เป็นโรคจาก PRSV-SMK ทาลงบนใบ *C. quinoa* ทำให้แยกเชื้อ PRSV-SMK ได้ 6 ไอโซเลท โดยให้ชื่อว่า PRSV-SMK3, PRSV-SMK4, PRSV-SMK5, PRSV-SMK6, PRSV-SMK7 และ PRSV-SMK8 นำเชื้อ PRSV-SMK และไอโซเลทที่ได้ปลูกเชื้อด้วยวิธีกลในมะละกอและแตงหนาม เพื่อยืนยันการเกิดโรคและคุณสมบัติของ PRSV-P แล้ว จากตัวอย่างน้ำคั้นที่ได้จากพืชที่ได้รับการปลูกเชื้อ PRSV-SMK ไอโซเลทต่าง ๆ ที่แสดงอาการใบต่างจุดวงแหวน พบผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 526 คู่เบส (bp) ที่อยู่ในยีน CP และผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 481 bp ของ 5' UTR จากทุกไอโซเลท ยกเว้น PRSV-SMK3 บ่งชี้ว่า PRSV-SMK5, PRSV-SMK6, PRSV-SMK7 และ PRSV-SMK8 เป็น PRSV-P เนื่องจากทำให้ทั้งมะละกอ และแตงเกิดโรคได้ซึ่งเป็นคุณสมบัติของ PRSV-P ในขณะที่เชื้อ PRSV-W ทำให้เกิดโรคได้กับแตงเท่านั้น (Gonsalves *et al.*, 2010; Tripathi *et al.*, 2008) เมื่อเปรียบเทียบส่วน 5' UTR พบว่าโคลนทั้งหมดของ PRSV-SMK5 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับของ PRSV-SMK ขณะที่โคลนของไอโซเลทอื่น ๆ พบว่ามีความแตกต่างไปจากของ PRSV-SMK และพบการหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย ดังนั้นจึงเลือกไอโซเลท PRSV-SMK5 มาทำการทดลองต่อไปเพื่อให้การถอดรหัสและการแปลรหัสของจีโนมจากโคลนที่สร้างขึ้นมีความถูกต้องและมาจากแหล่งเชื้อเดียวกันมากที่สุด

### การสร้าง cDNA และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมของ PRSV-SMK5

จากการสังเคราะห์พลาสมิดสายผสมของ

pGEM®-T easy vector กับชิ้นย่อยของจีโนม PRSV ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในซ้ำของแต่ละชิ้นย่อยของจีโนมเชื้อ PRSV-SMK5 นั้น พบมีความแตกต่างกันและบางโคลนมีการหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ เลือกโคลนของพลาสมิด pGEM-F1, pGEM-F2, pGEM-F3, pGEM-F4, pGEM-F5, pGEM-F6 และ pGEM-F7 ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับ PRSV-SMK มากที่สุดและไม่มีการขาดหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ พลาสมิดละหนึ่งโคลนเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการสร้างพลาสมิด pCF1, pCF13, pCF14, pCF15 และ pCF17 ที่จะเป็น infectious clone ตามลำดับต่อไป

### การสร้างโคลน cDNA สายเต็มจาก PRSV-SMK5

การสร้างโคลน cDNA สายเต็มจาก PRSV-SMK5 ที่ได้จากการนำชิ้นย่อยของจีโนมมาต่อกันนั้น ได้โคลน pCF17\_7 และ pCF17\_8 มีความยาวเท่ากัน ทั้งสองโคลนและเท่ากับ PRSV-SMK5 จำนวน 10,358 nts ประกอบด้วย ส่วนที่ไม่ได้ถอดรหัสที่ปลาย 5' จำนวน 85 nts, ส่วนที่สามารถถอดรหัสได้จำนวน 10,032 nts, ส่วนที่ไม่ได้ถอดรหัสที่ปลาย 3' จำนวน 206 nts และส่วน poly(A) ที่สังเคราะห์เพิ่มขึ้นมา 35 nts ซึ่งขนาดของจีโนมจำนวน 10,323 nts (85+10,032+206) โดยไม่รวมส่วน poly(A) มีขนาดสั้นกว่า PRSV-HA ที่มีรายงานจำนวน 10,326 nts (GenBank accession number S46722) (Yeh *et al.*, 1992) โดยมีส่วนที่ไม่ได้ถอดรหัสที่ปลาย 5' 85 nts และที่ปลาย 3' 206 nts เท่ากับที่รายงานใน PRSV-HA (Tripathi *et al.*, 2008) และมีลำดับนิวคลีโอไทด์และส่วนที่สามารถถอดรหัสเป็น polyprotein ขนาด 3,343 เหมือนกับจีโนมของ PRSV-SMK 98.4 เปอร์เซ็นต์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pCF17\_7 และ pCF17\_8 แตกต่างกัน 0.03% (3 nts) และต่างจาก PRSV-SMK 1.59% และ 1.62% ตามลำดับ โดยส่วน F6 ถึง F7 ที่มีขนาด 2.174 kb สามารถนำผลผลิต



พีซีอาร์ส่วนนี้ใช้แยกระหว่าง pCF17\_7 และ PRSV-SMK5 กับ pCF17\_8 ได้ เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนนี้ของ pCF17\_7 และ PRSV-SMK5 มีตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hpa*II จำนวน 2 ตำแหน่งทำให้เมื่อตัดด้วย *Hpa*II จะได้ดีเอ็นเอ 3 ชิ้น ขนาด 524 bp, 703 bp และ 947 bp ต่างจาก pCF17\_8 ที่มีตำแหน่งของ *Hpa*II ในส่วนนี้เพียง 1 ตำแหน่งทำให้ได้ ดีเอ็นเอ 2 ชิ้น ขนาด 524 bp และ 1,650 bp

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน pCF17\_7 และ pCF17\_8 ที่แตกต่างกัน 3 nts ที่ต่างตำแหน่งกัน แต่ส่งผลต่อการเปลี่ยนลำดับกรดล้าตบกรดอะมิโนเพียง 1 ตำแหน่ง โดยมีลำดับกรดอะมิโนของทั้งสองโคลนต่างกัน 0.03% และต่างจาก PRSV-SMK 1.59% และ 1.62% ตามลำดับ โคลน pCF17\_8 มีตำแหน่งที่ต่างจาก pCF17\_7 และ PRSV-SMK5 ได้แก่ กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 3,113 ในส่วนของยีน CP ซึ่งเป็นแอสพาร์ติกต่างจากอะลานีนในลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งเดียวกันของ pCF17\_7 และ PRSV-SMK5

ในการออกแบบการการสร้างโคลน cDNA สายเต็ม จากเดิมที่จะใช้การโคลนที่ละชิ้นด้วยเทคนิคพีซีอาร์ แต่เนื่องจากด้วยวิธีการนี้จำเป็นต้องใช้ตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีเพียงตำแหน่งเดียวบนจีโนม จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง PRSV-SMK และ PRSV-SMK5 พบว่าการวางแผนการแทรก F3 เข้าระหว่าง *Bst*BI และ *Not*I เพื่อต่อ F2 เข้ากับ F3 ในพลาสมิดนั้นไม่สามารถทำได้เนื่องจากพบตำแหน่ง *Bst*BI ใน F1 และ F3 ของทั้ง PRSV-SMK และ PRSV-SMK5 ดังนั้นจึงเปลี่ยนมาแทรกผลผลิตพีซีอาร์ที่ครอบคลุมทั้งส่วนของ F2 และ F3 เข้าระหว่าง *Pac*I และ *Not*I ใน pCF1 แทน นอกจากนี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่ต่างกันบางส่วนเกิดขึ้นที่ตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ส่งผลให้การวางแผนการแทรก F5 เข้าระหว่าง *Bss*HIII และ *Not*I ใน pCF14 นั้นไม่สามารถทำได้ เนื่องจากพบตำแหน่ง *Bss*HIII ในส่วน F3 ของ PRSV-SMK5 ดังนั้นจึงเปลี่ยนมาแทรกผลผลิตพีซีอาร์ที่ครอบคลุมทั้งส่วน F4 และ

F5 เข้าระหว่าง *Spe*I และ *Not*I ใน pCF14 แทน

### การประเมินการทำให้การเกิดโรคของ cDNA โคลน เติมสายจาก PRSV-SMK5

ต้นมะละกอตดสอบที่ปลูกเชื่อมด้วยพลาสมิด pCF17\_7 และ pCF17\_8 ซึ่งเป็นโคลนที่มี cDNA เติมสายของจีโนมเชื้อ PRSV-SMK5 แสดงอาการโรคใบต่างจุดวงแหวนหลังจากการปลูกเชื่อมด้วยพลาสมิด 14 วัน พร้อมกับต้นที่ปลูกเชื่อมด้วยไวรัส PRSV-SMK5 โดยตรวจพบการถอดรหัสของอาร์เอ็นเอที่สังเคราะห์จากพลาสมิดด้วยเทคนิค RT-PCR ของยีน CP และพบการแปลรหัสของโปรตีนที่แปลรหัสมาจากอาร์เอ็นเอที่ถอดรหัสมาจากพลาสมิด เมื่อตรวจด้วย ELISA จากตัวอย่างน้ำคั้นของใบหลังได้รับการปลูกเชื่อม (Table 2)

การยืนยันอนุภาคท่อนยาวคดของ PRSV ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Figure 2) พบอนุภาคไวรัสชนิดท่อนยาวคด (flexuous rod) ในตัวอย่างที่สุ่มมาจากต้นที่ปลูกเชื่อมด้วย pCF17\_7 และ pCF17\_8 ซึ่งมีขนาดความยาวประมาณ 700 นาโนเมตร (nm) X 10 nm สอดคล้องกับรายงานของ Chiang and Yeh (1997) ที่มีขนาดอนุภาค PRSV ที่สร้างจาก infectious clone เป็นท่อนยาวคดขนาด 750 – 800 nm x 12 nm

จากผลการทดสอบพบว่าที่เวลา 21 หลังการปลูกเชื่อมด้วยพลาสมิด pCF17\_7 และ pCF17\_8 มีจำนวนต้นที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกด้วยเทคนิค ELISA (70 และ 20% ตามลำดับ) น้อยกว่า ผลการทดสอบด้วยเทคนิค RT-PCR (80 และ 90% ตามลำดับ) และให้จำนวนต้นที่ให้ผลบวกเท่ากันเมื่อเวลา 28 วัน แสดงให้เห็นว่าพลาสมิดที่เข้าไปในต้นพืชเกิดการถอดรหัสเป็นอาร์เอ็นเอทำให้สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยที่มีการสร้างโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคแต่มีปริมาณน้อยทำให้ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยเทคนิค ELISA ที่ 21 ภายหลังจากปลูกเชื่อม ซึ่งเป็นข้อจำกัดจากความไวของเทคนิคในการตรวจสอบที่ต่ำกว่า แต่สามารถตรวจพบได้เมื่อเวลา 28 วัน หลังจากปลูกเชื่อม นอกจากนี้การเพิ่มปริมาณของเชื้อที่ได้จากโคลนที่สร้างขึ้นมานั้นเพิ่ม

ขึ้นในอัตราที่ช้ากว่าเชื้อปกติ สังเกตได้จากบางต้นที่ปลูกเชื้อด้วยโคลนพลาสมิดแสดงอาการของโรคช้ากว่าเชื้อปกติที่แสดงอาการ 2 สัปดาห์หลังปลูกเชื้อ และค่า ELISA ที่มีค่าต่ำ โดยค่า ELISA ของตัวควบคุมบวกมีค่าเป็นสองเท่าของตัวควบคุมลบ ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงอาการของโรคหลังจากปลูกเชื้อ 4 สัปดาห์ของต้นที่ปลูกเชื้อด้วย PRSV-SMK5 มีความรุนแรงมากกว่าอาการของต้นที่

ปลูกเชื้อจากโคลนพลาสมิด พิจารณาการสะสมของเชื้อเรียงตามลำดับจากมากไปน้อยโดยการสังเกตค่า ELISA ได้ดังต่อไปนี้ หลังจากปลูกเชื้อ 3 สัปดาห์พบการสะสมของเชื้อที่สร้างจาก pCF17\_7 > PRSV-SMK5 > pCF17\_8 ขณะที่หลังจากปลูกเชื้อ 4 สัปดาห์พบการสะสมของเชื้อที่สร้างจาก PRSV-SMK5 > pCF17\_8 > pCF17\_7

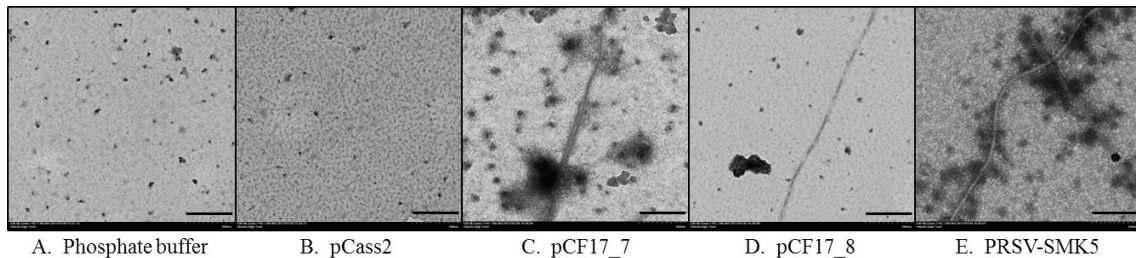
**Table 2** Detection of full-length cDNA clones of PRSV-P infectivity

| Inoculum  | ELISA test<br>infected/inoculated plants <sup>1</sup><br>(% infectivity)<br>{average ELISA value} |                                      |                                       | RT-PCR of CP gene<br>amplified/ inoculated samples<br>(% infectivity) |                            |
|---|---|--------------------------------------|---------------------------------------|---|----------------------------|
|   | 0 dpi   | 21 dpi                               | 28 dpi                                | 21 dpi  | 28 dpi                     |
| Phosphate buffer, pH 7.0                                | 0/10<br>(0%)<br>{0.138}   | 0/10<br>(0%)<br>{0.096}              | 0/10<br>(0%)<br>{0.107}               | 0/10<br>(0%)  | 0/10<br>(0%)               |
| Sap from PRSV-SMK5 infected<br>papaya leaf <sup>2</sup> | 0/10<br>(0%)<br>{0.160}   | 5/8 <sup>3</sup><br>(62%)<br>{0.255} | 8/8 <sup>3</sup><br>(100%)<br>{1.044} | 6/6 <sup>3</sup><br>(100%)  | 6/6 <sup>3</sup><br>(100%) |
| 21 dpi<br>40 µg of pCass2 <sup>2</sup>                  | 0/10<br>(0%)<br>{0.154}   | 0/10<br>(0%)<br>{0.099}              | 0/10<br>(0%)<br>{0.137}               | 0/10<br>(0%)  | 0/10<br>(0%)               |
| 40 µg of pCF17_7 <sup>2</sup>                           | 0/10<br>(0%)<br>{0.147}   | 7/10<br>(70%)<br>{0.270}             | 8/10<br>(80%)<br>{0.864}              | 8/10<br>(80%)   | 8/10<br>(80%)              |
| 40 µg of pCF17_8 <sup>2</sup>                           | 0/10<br>(0%)<br>{0.144}   | 2/10<br>(20%)<br>{0.147}             | 9/10<br>(90%)<br>{0.401}              | 9/10<br>(90%)   | 9/10<br>(90%)              |

<sup>1</sup> Infected plant showed severe systemic symptoms of PRSV and had the ELISA value, which was more than twice of the average ELISA value of the negative control (phosphate buffer)

<sup>2</sup> The average ELISA value calculated from the ELISA values, which each value was more than the average ELISA value of the negative control (phosphate buffer)

<sup>3</sup> The dead plants were not included in calculation



**Figure 2** Transmission electron micrographs using immuno electron microscopy of PRSV particles in crude sap prepared from the papayas inoculated with the *in vivo* infectious clones of PRSV-SMK5 (C-D) and positive control (E). The absence of any virus particles in negative controls (A-B) was shown. Black bar indicates 200 nanometers

Chiang and Yeh (1997), You *et al.* (2005) และ Chiampiriyakul (2007) รายงานการสร้างพลาสมิดที่เป็น *in vitro* infectious clone จากไวรัส PRSV-P และ PRSV-W ซึ่งถอดรหัสได้ RNA transcript ในหลอดทดลองที่ทำให้พืชอาศัยเกิดโรคได้ (infectious *in vitro* RNA transcript) พลาสมิดประกอบด้วย cDNA เต็มสายของจีโนมไวรัส PRSV ที่ควบคุมการถอดรหัสด้วยโปรโมเตอร์ของฟาจ (bacteriophage) เช่น SP6 T7 และ T3 promoter เป็นต้น และมีการพัฒนาพลาสมิดที่เป็น *in vivo* infectious clone ที่สามารถปลูกเชื้อด้วยพลาสมิดและถอดรหัสภายในเซลล์พืชได้เป็น *in vivo* RNA transcript โดยควบคุมการแสดงออกของยีนด้วย CaMV 35S promoter และประกอบด้วยสาย poly(A) ต่อจากลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน 3' untranslated region (UTR) และควบคุมการหยุดถอดรหัสด้วย CaMV 35S หรือ NOS-terminator ซึ่งทำให้ส่งพลาสมิดแบบนี้เข้าสู่พืชได้สะดวกและหลายวิธีเช่นใช้ผงคาร์บอนรันดรีมทำแผล (Meyer and Dessens, 1997) และใช้เครื่องยิงอนุภาค (Desbiez *et al.*, 2012) โดยพลาสมิดที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้คือ pCass2 ซึ่งควบคุมการแสดงออกโดยใช้ CaMV 35S promoter จำนวนสองชุดต่อเนื่องกัน (Shi *et al.*, 1997) และการเพิ่มส่วน poly(A) เพิ่มเข้าไปอีก 35 nts ที่ทำให้อาร์เอ็นเอมีความเสถียรมากขึ้น ส่งผลให้การ

แสดงออกของยีน สังเคราะห์โปรตีนมากขึ้น และสามารถเข้าสู่พืชได้จากการปลูกเชื้อด้วยวิธีกล

## สรุป

ในการศึกษานี้ได้ทำการโคลนจีโนมเต็มสายของเชื้อไวรัสใบต่างจุดวงแหวนมะละกอ (*Papaya Ringspot Virus* (PRSV-P) สายพันธุ์ไทย โดยการสังเคราะห์ cDNA ของจีโนมเชื้อไวรัส PRSV-SMK5 ด้วยปฏิกิริยา reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) เป็นส่วน ๆ จำนวน 7 ชิ้น ย่อย มีความยาวตั้งแต่ 493 ถึง 2,706 นิวคลีโอไทด์ (nts) โดยกำหนดให้แต่ละชิ้นซ้อนเหลื่อมกันทั้งจีโนม ใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีเพียงหนึ่งตำแหน่งบนจีโนม แล้วโคลนเข้าพลาสมิด pGEM®-T easy เพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ และเป็นแหล่งสังเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อโคลนเข้าพลาสมิด pCass2 ที่ใช้ในการแสดงออกซึ่งขับเคลื่อนการถอดรหัสของยีน (transcription) ด้วยชุดโปรโมเตอร์ *Cauliflower mosaic virus* 35S (CaMV 35S promoter) จำนวนสองชุดต่อเนื่องกัน และการหยุดการถอดรหัสด้วย CaMV 35S terminator โดยการโคลนนิ่งแบบต่อเนื่องเป็นลำดับ ด้วยเทคนิค overlap extension PCR cloning ได้โคลน cDNA

เต็มสายของจีโนมเชื้อ PRSV-SMK5 จำนวนสอง พลาสมิดให้ชื่อว่า pCF17\_7 และ pCF17\_8 พลาสมิด ทั้งสองมีความยาวของจีโนม 10,358 nts ซึ่งรวมส่วน ปลาย 3' poly(A) จำนวน 35 nts โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ 10,032 nts ที่ถอดรหัสได้เป็น polyprotein ประกอบด้วย 3,343 กรดอะมิโน และส่วนไม่ถอดรหัส ที่ปลาย 5' จำนวน 85 nts และที่ปลาย 3' จำนวน 206 nts โดยทั้งสองโคลนมีลำดับนิวคลีโอไทด์และ กรดอะมิโนเหมือนกับ PRSV-SMK5 เท่ากันที่ 98.4% พลาสมิดทั้งสองโคลนทำให้มะละกอเกิดอาการโรค ใบต่างจุดวงแหวนมะละกอ หลังการปลูกเชื้อด้วย พลาสมิดเป็นเวลา 21 วัน ตรวจยืนยันพบสาร พันธุกรรมอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR และโปรตีนห่อหุ้มของเชื้อ PRSV ด้วยเทคนิค ELISA และยังตรวจพบอนุภาคของเชื้อไวรัส PRSV เมื่อตรวจ ดูด้วยเทคนิค immuno electron microscopy

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน จ. นครปฐม 73140 จากศูนย์ความเป็นเลิศ ด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900 และได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทบัณฑิตศึกษา จากสำนักงาน คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปี 2558 และ Professor Shyi-Dong Yeh, Laboratory of Molecular Plant Virology, National Chung Hsing University, Taiwan ที่เปิดโอกาสการเรียนรู้แก่ ชูติรัตน์ อัครเทพ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร. ศรีเมฆ ชาวโพรงปาง ที่อนุเคราะห์ PRSV antibody และเชื้อ PRSV-SMK ที่ใช้ในการศึกษานี้ และขอบคุณ ดร.ปาริชาติ เบิร์นส ที่ให้คำแนะนำและสนับสนุน pCass2 ในการวิจัยนี้

## เอกสารอ้างอิง

- Attasart, P. 2003. Genome Characterization and Construction of *Papaya Ringspot Virus* Type W (PRSV-W) Infectious Transcript. Ph.D. Thesis, Mahidol University, Nakhon Pathom. (in Thai)
- 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, Nakhon Pathom. (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 *NlaPro* of *Papaya ringspot virus* determines host specificity for infection of papaya. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21: 1046–1057.
- Chiang, C.H. and S.D. Yeh. 1997. Infectivity assays of *in vitro* and *in vivo* transcripts of *Papaya ringspot potyvirus*. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 38: 153–163.
- Chiangpiriyakul, P. 2007. Construction of an Infectious Full-Length cDNA Clone of a *Papaya Ringspot Virus* type W. Ph.D. Thesis, Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)
- Chokboon, V. 2011. Nucleotide Sequence, Sub-genomic Construction, and Pathogenicity Test of *Papaya Ringspot Virus* Strain Samut Sakhon (PRSV-SMK). MS Thesis, Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)

- Clark, M.F., and A.N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475–483.
- Conover, R.A. 1964. Distortion ringspot, a severe virus disease of papaya in Florida. *Proc. Fla State Hort. Soc.* 77: 440.
- Desbiez, C., C. Chandeysson, H. Lecoq and B. Moury. 2012. A simple, rapid and efficient way to obtain infectious clones of potyviruses. *J. Virol. Methods* 183: 94-97.
- Gonsalves, D. and M. Ishii. 1980. Purification and serology of *Papaya ringspot virus*. *Phytopathology* 70: 1028–1032.
- 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.
- Libsittikul, S. Khongwichit, D.R. Smith and Y.K. Yap. 2015. Evaluation of *Papaya ringspot virus* as a vector for expression of dengue E protein domain III in *Cucurbita pepo* (zucchini) plants. *J. Anim. Plant Sci.* 25: 809–815.
- Meyer, M. and J.T. Dessens. 1997. 35S promoter-driven cDNAs of *Barley mild mosaic virus* RNA1 and RNA2 are infectious on barley plants. *J. Gen. Virol.* 78: 3147–3151.
- Purcifull, D.E., J.R. Edwardson, E. Hiebert and D. Gonsalves. 1984. *Papaya ringspot virus*. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No. 292 (No. 84 revised). Commonwealth Mycol. Inst. /Associ. of Applied Biologists, Kew, Surrey, UK.
- Sambrook, J., E.F. Fritschi and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- 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.
- Sievers, F., A. Wilm, D. Dineen, T.J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Soding, J.D. Thompson and D.G. Higgins. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7: 539.
- Tripathi, S., J. Y. Suzuki, S. A. Ferreira and D. Gonsalves. 2008. *Papaya ringspot virus*-P: characteristics, pathogenicity, sequence variability and control. *Mol. Plant Pathol.* 9: 269–280.
- Tuo, D., W. Shen, P. Yan, X. Li and P. Zhou. 2015. Rapid construction of stable infectious full-length cDNA clone of papaya distortion mosaic virus using In-Fusion cloning. *Viruses* 7: 6240–6250.
- Yeh, S.D., F.J. Jan, C.H. Chiang, T.J. Doong, M.C. Chen, P.H. Chung and H.J. Bau. 1992. Complete nucleotide sequence and genetic organization of *Papaya ringspot virus* RNA. *J. Gen. Virol.* 73: 2531–2541.
- You, B.J., C.H. Chiang, L.F. Chen, W.C. Su and S.D. Yeh. 2005. Engineered mild strains of *Papaya ringspot virus* for broader cross protection in cucurbits. *Phytopathology* 95: 533–540.