การตรวจเชื้อ *Squash leaf curl Yunnan virus* ในพืชวงศ์แตง ด้วยเทคนิค Loop–Mediated Isothermal Amplification

Use of Loop–Mediated Isothermal Amplification for the detection of *Squash leaf curl Yunnan virus* in Cucurbits

รุ่งทิพย์ จั่นเพ็ชร[1,2] วิชัย โฆสิตรัตน[1,2,3] Scott Adkins[4] และ สุจินต์ ภัทรภูวดล[1,2,3,*]

Rungthip Junpetch[1,2], Wichai Kositratana[1,2,3], Scott Adkins[4] and Sujin Patarapuwadol[1,2,3,*]

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[2] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[3] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา 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

[4] United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 2001 South Rock Road, Fort Pierce, FL 34945-3030, USA

รับเรื่อง: กรกฎาคม 2559 Received: July 2016

รับตีพิมพ์: สิงหาคม 2559 Accepted: August 2016

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

ABSTRACT: A Loop–Mediated Isothermal Amplification (LAMP) assay was developed for detection of *Squash leaf curl Yunnan virus* isolate TH–PK–2016 (SLCuYV–TH–PK–2016) (Genbank accession KX388157), originally isolated from Cucurbita moschata Decne in Nakhon Pathom province of Thailand. Four LAMP primers (B3, F3, BIP and FIP) were designed from the SLCuYV–TH–PK–2016 Replication-associated protein gene (AC1) to amplify a product at 65 °C in 60 min. LAMP products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis or visualized from SYBR® Green I. Results demonstrated specific detection of SLCuYV–TH–PK–2016 by the developed LAMP assay with a sensitivity of 134 pg/µl of template DNA equalivalent to polymerase chain reaction (PCR). Thus, LAMP provides an alternative assay for rapid, specific and sensitive diagnosis of SLCuYV–TH–PK–2016 in cucurbit plants

Keywords: LAMP, *Squash leaf curl yunnan virus*, Cucurbits

Agricultural Sci. J. (2017) Vol. 48(2): 221–230 ว. วิทย. กษ. (2560) 48(2): 221–230

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิค Loop–Mediated Isothermal Amplification (LAMP) เพื่อตรวจสอบเชื้อ *Squash leaf curl Yunnan virus* ไอโซเลท TH–PK–2016 (SLCuYV–TH–PK–2016) (Genbank accession KX388157) ที่เข้าทำลายฟักทอง (*Cucurbita moschata* Decne) ในจังหวัดนครปฐมของประเทศไทย โดยใช้ชุด ไพรเมอร์จำนวน 4 เส้น (B3, F3, BIP และ FIP) ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะกับ Replication-associated protein gene (AC1) ของเชื้อ SLCuYV–TH–PK–2016 และทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 °C นาน 60 นาที สามารถตรวจสอบผลการเกิดปฏิกิริยาด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis หรือตรวจสอบได้โดยตรงเมื่อเติมสีย้อม SYBR® Green I พบว่าเทคนิคนี้มีความจำเพาะในการเกิดปฏิกิริยาต่อเชื้อ SLCuYV–TH–PK–2016 โดยไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) และพืชปกติที่นำมาตรวจสอบ มีความไวในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเทคนิค LAMP และ Polymerase Chain Reaction (PCR) เท่ากัน คือสามารถใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ความเข้มข้นต่ำสุด 134 pg/µl ดังนั้นเทคนิคนี้จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่รวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ SLCuYV–TH–PK–2016

คำสำคัญ: เทคนิคแลมป์, ไวรัส Squash leaf curl yunnan virus, พืชวงศ์แตง

บทนำ

โรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัสของพืชวงศ์แตงมีหลายชนิด เช่น โรคใบหงิกเหลืองที่เกิดจากเชื้อไวรัสในวงศ์ *Geminiviridae* ในจีนัส *Begomovirus* ได้แก่ *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) (Mansoor *et al*., 2000) *Tomato yellow leaf curl virus* (Anfoka *et al.,* 2009) และ *Squash leaf curl virus* (SqLCV) (Flock and Mayhew, 1981) เชื้อไวรัสชนิดนี้มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว ที่มีการแพร่กระจายในหลายประเทศทั่วโลก มีพืชอาศัยค่อนข้างกว้าง และเข้าทำลายพืชได้หลายชนิด เช่น พริก มะเขือเทศ และพืชวงศ์แตง เป็นต้น สามารถถ่ายทอดโรคได้โดยอาศัยแมลงหวี่ขาว (Mason *et al*., 2000) โดยพืชที่ถูกเข้าทำลายจะแสดงอาการใบหงิก ใบลดรูป ใบมีการเจริญผิดรูป และต้นเตี้ยแคระ Xie and Zhou (2003) ได้ศึกษาสาเหตุของโรคที่ทำให้สควอชในมณฑลยูนนานประเทศจีนมีอาการใบม้วน (leaf curl) พบว่าเกิดจากเชื้อ *Squash leaf curl Yunnan virus* (SLCYNV) (AJ420319) ซึ่งมีจีโนมของบริเวณ DNA–A ขนาด 2,714 นิวคลีโอไทด์ และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพบว่ามีความใกล้เคียงกับเชื้อไวรัส *Tomato yellow leaf curl Thailand virus* (TYLCTHV) (X63015) ที่ค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ 84 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากการสังเกตลักษณะอาการของโรคเพียงอย่างเดียวไม่สามารถวินิจฉัยโรคและชนิดเชื้อที่เข้าทำลายได้ การตรวจวินิจฉัยได้อย่างถูกต้องแม่นยำจึงมีความสำคัญ ปัจจุบันมีการตรวจสอบเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืชหลายวิธี อาทิ เช่น Enzyme–linked immunosorbent assay (ELISA), Western blotting, Reverse transcription polymerase chain reaction (RT–PCR) และ Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยวิธีการตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA เป็นการตรวจโปรตีนของเชื้อไวรัส และจำเป็นต้องผลิตแอนติบอดีให้จำเพาะต่อเชื้อไวรัส ในขณะที่เทคนิค PCR และ RT–PCR มีหลักการที่คล้ายกัน คือการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุให้มีปริมาณมากเพียงพอที่จะตรวจพบเชื้อได้ แต่มีข้อจำกัดคือ ในกระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ต้องมีการลดเพิ่มอุณหภูมิถึงสามระดับจึงจำเป็นต้องใช้เครื่องมือในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่มีความจำเพาะ (Thermal cycler) และใช้เวลาในการตรวจสอบนาน 2–4 ชั่วโมง

ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคที่มีความซับซ้อนน้อยกว่าแต่มีประสิทธิภาพสูง คือ เทคนิค Loop–Mediated Isothermal Amplification (LAMP) ที่อาศัยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสชนิด strand displacement มาสังเคราะห์สารพันธุกรรม ทำให้ใช้อุณหภูมิที่ 60–65 ºC เพียงอุณหภูมิเดียว สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้มากถึง 10^9 เท่า ภายในเวลาไม่ถึงหนึ่งชั่วโมง และมีความจำเพาะสูงเนื่องจากใช้ไพรเมอร์ (primer) จำนวน 4 ชนิด (Mori and Notomi, 2009) ซึ่งเหมาะต่อการตรวจเชื้อในจีนัส *Begomovirus* ที่มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอ ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิค LAMP มาใช้ในการตรวจเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืชหลายชนิด เช่น Fukuta *et al*. (2003) พัฒนาเทคนิค LAMP เพื่อตรวจสอบเชื้อ TYLCV ในประเทศญี่ปุ่นโดยออกแบบชุดไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ 4 บริเวณบนยีน *AV2 AC4* และ intergenic region จากการตรวจสอบพบว่าไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน AV2 สามารถตรวจเชื้อ TYLCV–Aichi และ TYLCV–Nagasaki ทั้งสองไอโซเลทในประเทศญี่ปุ่นได้ แต่ไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน AC4 ตรวจได้เพียง TYLCV–Aichi เท่านั้น ซึ่งเป็นคุณสมบัติของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะสูงที่สามารถออกแบบเพื่อให้ตรวจสอบเชื้อได้ในระดับสายพันธุ์ นอกจากนี้ Almasi *et al*.(2013) ได้ประยุกต์ใช้เทคนิค LAMP ในการตรวจเชื้อ TYLCV ที่เข้าทำลายมะเขือเทศในประเทศอิหร่านได้ โดยการอ่านผลด้วยตาเปล่าจากการย้อมสี LAMP product ซึ่งเห็นได้ว่าเทคนิคนี้มีประสิทธิภาพ และความจำเพาะสูง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคใบหงิกเหลืองของพืชวงศ์แตงที่เกิดจากเชื้อ *Squash leaf curl Yunnan virus* ด้วยเทคนิค LAMP ได้อย่างจำเพาะ

อุปกรณ์ และวิธีการ

แหล่งที่มาของเชื้อไวรัส *Squash leaf curl Yunnan virus* ไอโซเลท TH–PK–2016 และการเตรียมตัวอย่างพืชวงศ์แตงที่แสดงอาการของโรคใบหงิกเหลือง

เชื้อ SLCuYV ไอโซเลท TH–PK–2016 (Genbank accession KX388157) ซึ่งพบในฟักทองที่แสดงอาการใบหงิกเหลือง ใบม้วน ใบลดรูป ใบบิดเบี้ยวผิดรูปร่าง และต้นเตี้ยแคระ ในจังหวัดนครปฐม ที่ผ่านการตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA PCR และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน TEM จากนั้นนำดีเอ็นเอของเชื้อมาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Rolling circle amplification (RCA) เพื่อทำการจัดจำแนก (Junpetch, 2016) และนำมาเป็นต้นแบบในการศึกษาเพื่อพัฒนาเทคนิค LAMP

เก็บตัวอย่างพืชวงศ์แตงในจังหวัดนครปฐมที่แสดงอาการใบหงิกเหลือง นำมาตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค ELISA ด้วยแอนติซีรัมชนิด MAb ที่จำเพาะกับเชื้อ *Begomovirus* (Monoclonal Antibody Production Laboratory National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Pathumtani, Thailand) แล้วคัดเลือกตัวอย่างที่ให้ผลบวกนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วย Genomic DNA Mini kit (Plant) Protocol (Geneaid, Taipae, Taiwan) เพื่อนำมาใช้เป็นตัวควบคุมบวกในการตรวจเชื้อ SLCuYV–TH–PK–2016 ด้วยเทคนิค LAMP ต่อไป

การออกแบบไพรเมอร์เพื่อตรวจเชื้อ *Squash leaf curl Yunnan virus* ไอโซเลท TH-PK-2016 ด้วยเทคนิค LAMP

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ SLCuYV–TH–PK–2016 (KX388157) มาออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer Explorer version 4 (https://primerexplorer.jp/e/index.html) สำหรับการตรวจสอบด้วยวิธี LAMP ชุดไพรเมอร์ออกแบบให้จำเพาะกับยีนเป้าหมายคือ *AC1* (Rep gene) โดยไพรเมอร์มีความจำเพาะกับ 6 ตำแหน่งของยีนเป้าหมาย หนึ่งชุดไพรเมอร์ประกอบด้วย 4 เส้น คือ B3, F3, BIP และ FIP โดยมีลำดับเบสของ ไพรเมอร์ดังนี้

SLCuYV-B3 5´ GGCAAAAAATATCTTTCTCACTT 3´
SLCuYV-F3 5´ CTGGGGTTTCTGAACTGG 3´
SLCuYV-BIP 5´ TGTCAGATGGACATGAAATGTTTTG-CCCAAAATGCCCATTACCA 3´
SLCuYV-FIP 5´ TCAGAGTATCACAAGAAAAACACCA-CTTTGAATTGGATGAGCGC 3´

องค์ประกอบของสารในปฏิกิริยาการตรวจเชื้อ *Squash leaf curl Yunnan virus* ด้วยเทคนิค LAMP

การตรวจเชื้อ SLCuYV ด้วยเทคนิค LAMP ดัดแปลงวิธีการมาจาก Kuan *et al*., (2010) มีองค์ประกอบของสารต่าง ๆ ดังนี้ การทำปฏิกิริยา LAMP ปริมาตร 25 µl ประกอบด้วย 0.4 µM SLCuYV-B3, 0.4 µM SLCuYV-F3, 6.4 µM SLCuYV-BIP, 6.4 µM SLCuYV-FIP, 1.4 mM dNTPs, 1 M Betaine (Sigma–Aldrich), 1X Thermo buffer, 8U *Bst* DNA polymerase large fragment (Biolabs®) และ 5 mM $MgSO_4$ แล้วเติม 1 µl ของดีเอ็นเอตัวอย่าง โดยมีการเกิดปฏิกิริยาได้เมื่ออุณหภูมิประมาณ 65 °C นาน 60 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่ 90 °C นาน 2 นาที หลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยาตรวจผลบน 1.5% agarose gel electrophoresis ใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 40 นาที และสังเกตผลด้วยตาเปล่าหรือเติมสาร SYBR® Green I (Invitrogen, USA) (1:10) 1.5 µl ซึ่งสามารถพบการเปลี่ยนสีจากสีตั้งต้นของสาร SYBR Green I ซึ่งเป็นสารสีส้มเปลี่ยนสีเป็นสีเขียวเรืองแสงได้ในหลอดที่เกิดปฏิกิริยา

การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของปฏิกิริยา LAMP

ตรวจสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา LAMP ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบฟักทองที่แสดงอาการใบหงิกเหลือง ใบบิดเบี้ยวผิดรูปร่าง ใบลดรูป ต้นเตี้ยแคระ และให้ผลบวกกับแอนติบอดีต่อเชื้อ TYLCV จากการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค ELISA ดีเอ็นเอฟักทองปลอดโรค ดีเอ็นเอมะเขือเทศปลอดโรค และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นตัวอย่างควบคุม โดยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 °C นาน 60 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 90 °C นาน 2 นาที และใช้องค์ประกอบสารต่าง ๆ ดังแสดงข้างต้น ตรวจสอบผลด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ยืนยันความถูกต้องโดยส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ LAMP product (First Base Laboratories Sdn. Bhd., Selangor, Malaysia) ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาดประมาณ 200–500 bp นำมาศึกษาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์เชื้อไวรัสที่ตรวจได้ด้วยโปรแกรม BLAST ผ่านเครือข่ายทางอินเตอร์เน็ต (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

การทดสอบความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา LAMP เปรียบเทียบกับการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค PCR

ดีเอ็นเอที่ผ่านการตรวจยืนยันว่ามีเชื้อ SLCuYV ที่ค่าความเข้มข้นดีเอ็นเอเริ่มต้น 134 ng/µl นำมาเจือจางเป็น 10 เท่าตั้งแต่ 10^{-1} จนถึง 10^{-6} แล้วใช้เป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา LAMP และใช้องค์ประกอบต่างๆ ตามข้อ 3 ที่อุณหภูมิ 65 °C นาน 60 นาที ตรวจสอบเชื้อด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน *AC1* คือ AC1–F 5´ TCAACTCTCCGTCG TCTGAT 3´ และ AC1–R 5´ ATGCCACGCACAAACCAC 3’ และใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่วัดค่าความเข้มข้นดีเอ็นเอที่นำมาเจือจางตั้งแต่ 134 ng/µl, 134 ng/µl x 10^{-1}, 134 ng/µl x 10^{-2}, 134 ng/µl x 10^{-3}, 134 ng/µl x 10^{-4}, 134 ng/µl x 10^{-5} และ 134 ng/µl x 10^{-6} เช่นเดียวกับเทคนิค LAMP มาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ โดยมีองค์ประกอบของสารต่างๆ ดังนี้ 2X master mix PCR reaction (Promega, Madison, USA) 12.5 µl ปริมาตรรวม 25 µl เติมไพรเมอร์ AC1–F และ AC1–R ความเข้มข้น 10 µM อย่างละ 1.25 µl และเติมดีเอ็นเอต้นแบบ 1 µl ทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้ pre–denature ที่อุณหภูมิ

94 °C นาน 3 นาที denature ที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 56 °C นาน 30 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 3 นาที จำนวน 20 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 7 นาที จากนั้นวิเคราะห์ผลด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis

ผลการทดลอง และวิจารณ์

แหล่งที่มาของเชื้อไวรัส *Squash leaf curl Yunnan virus* ไอโซเลท TH–PK–2016 และการเตรียมตัวอย่างพืชวงศ์แตงที่แสดงอาการของโรคใบหงิกเหลือง

ตัวอย่างจากแปลงปลูกฟักทองจังหวัดนครปฐมที่แสดงอาการใบม้วนรูปถ้วย ใบหงิกเหลือง ใบย่น และใบเจริญผิดรูปร่าง (Figure 1) ตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA แล้วคัดเลือกตัวอย่างฟักทองที่ให้ผลเป็นบวกต่อเชื้อ *Begomovirus* ได้จำนวน 32 ตัวอย่าง จากนั้นคัดเลือกตัวอย่างมาทำการตรวจอนุภาคไวรัสด้วยกล้อง TEM และศึกษายีนห่อหุ้มอนุภาค (CP gene) พบว่าตัวอย่าง Cus6201 ที่พบในฟักทอง จากจังหวัดนครปฐม มีอนุภาคไวรัสเป็นแบบทรงกลมคู่ (twinned praticle) มี *CP* gene คล้ายคลึงกับเชื้อ *Begomovirus* ได้แก่ *Tomato yellow leaf curl Thailand virus* (TYLCVTH) ในมะเขือเทศของประเทศไทย จีน และพม่า รวมทั้งเชื้อ *Tobacco leaf curl virus* (ToLCV) ในยาสูบ และ *Tomato leaf curl new Delhi virus* (ToLCNDV) ใน bottle gourd ของประเทศไทย จึงได้ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 2,740 bp บริเวณ DNA-A ของจีโนมเชื้อไวรัสด้วยโปรแกรม BLAST พบว่าไอโซเลท Cus6201 มีความใกล้เคียงกับส่วน DNA–A ของเชื้อไวรัส *Squash leaf curl Yunnan virus* หรือ SLCuYV– [CN–Yun–Y23] (AJ420319.1) มากที่สุด โดยมีค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 92 เปอร์เซ็นต์ และได้ส่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เก็บในฐานข้อมูล Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html) ได้รับ accession number คือ KX388157 โดยมีชื่อไอโซเลทคือ SLCuYV–TH–PK–2016 จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบจากเชื้อ SLCuYV–TH–PK–2016 เพื่อใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อ SLCuYV

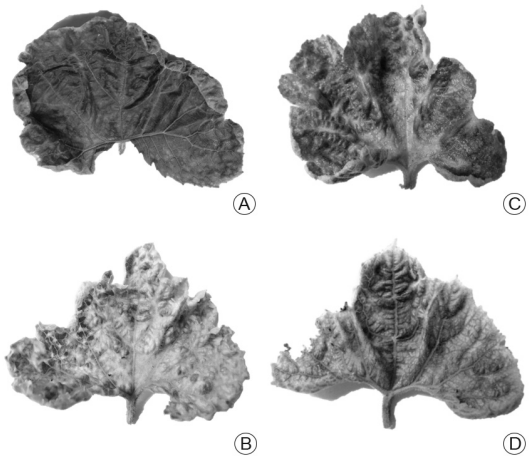

Figure 1 Leaf symptoms on field collected pumpkin (A) leaf cupping, (B) yellow leaf curl, (C) leaf curl and (D) leaf malformation

การออกแบบไพรเมอร์เพื่อตรวจเชื้อ *Squash leaf curl Yunnan virus* ด้วยเทคนิค LAMP

นำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน AC1 จากเชื้อ SLCuYV ไอโซเลท TH-PK-2016 (KX388157) มาทำการออกแบบไพรเมอร์ เนื่องจากเป็นบริเวณที่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ SLCuYV ไอโซเลท TH-PK-2016 ออกจากเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใกล้เคียง เช่น *Tomato yellow leaf curl Thailand virus* ได้มีตำแหน่งการเข้าจับที่ตำแหน่งเบส 2,377 ถึง 2,568 บนยีน *AC1* (Figure 2) และมีค่า Melting Temperature (Tm) ของเส้นไพรเมอร์ B3, F3, BIP และ FIP อยู่ที่ 49.8°C 50.9°C 66.4°C และ 66.5°C ตามลำดับ

```
        5'
2377    CTGGGGTTTC TGAACTGGCA  TTTACCTTTG AATTGGATGA GCGCATGGAT ATGCAGAGAC
                F3                                FIP

2437    CCATCCTGGT GTTTTTCTTG  TGATACTCTG ATAAATAATT  TGTCAGATGG ACATGAAATG
                         FIP                                        BIP

2497    TTTTGCAGGA GTTCGAGCAT  ATGCTCTTTT GGTAATGGGC  ATTTTGGGAA AGTGAGAAAG
         BIP                                     BIP                B3

2557    ATATTTTTTG CC
            B3
                  3'
```

Figure 2 LAMP primers (arrows) designed from AC1 gene of SLCuYV–TH–PK–2016 (KX388157) and used for LAMP detection

การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของชุดไพรเมอร์ LAMP

ทดสอบความจำเพาะของเทคนิค LAMP โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *AC1* ของเชื้อ SLCuYV–TH–PK–2016 นำมาตรวจดีเอ็นเอจากตัวอย่างฟักทอง Cus15, Cus16, CusLL1, เชื้อ SLCuYV ในฟักทอง เชื้อ TYLCV ในมะเขือเทศ ฟักทองปลอดโรค แตงกวาปลอดโรค มะเขือเทศปลอดโรค และน้ำกลั่น จากผลการทดสอบพบว่าชุดไพรเมอร์ *AC1* สามารถตรวจเชื้อ SLCuYV–TH–PK–2016 ได้ในตัวอย่าง Cus15, Cus16, CusLL1 และ SLCuYV–TH–PK–2016 ในฟักทองที่เป็นตัวอย่างควบคุมบวก (positive control) และไม่เกิดปฏิกิริยากับเชื้อ TYLCV ในมะเขือเทศ ฟักทองปลอดโรค แตงกวาปลอดโรค มะเขือเทศปลอดโรค และน้ำกลั่นที่เป็นตัวอย่างควบคุมลบ (negative control) จากผลการวิเคราะห์ LAMP product ด้วยเทคนิค gel electrophoresis พบดีเอ็นเอลักษณะคล้ายขั้นบันไดในตัวอย่างที่พบเชื้อ SLCuYV–TH–PK–2016 คือ Cus15, Cus16, CusLL1 และฟักทองที่มีเชื้อ SLCuYV (Figure 3A) และเมื่อเติมสาร SYBR Green I ในหลอดที่มี LAMP product จะพบการเรืองแสงสีเขียวที่สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า (Figure 3B) เช่นเดียวกับการตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เมื่อเติมสาร SYBR Green I ใน LAMP product หลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยา พบการเรืองแสงในตัวอย่างที่ตรวจได้ (Figure 3C) โดยการตรวจสอบผลทั้ง 3 วิธีให้ผลที่สอดคล้องกัน จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อยืนยันความถูกต้องของ LAMP product ของตัวอย่าง Cus15, Cus16, CusLL1 และฟักทองที่มีเชื้อ SLCuYV พบว่าดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค LAMP มีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ 99 และ 95 เปอร์เซ็นต์กับเชื้อ SLCuYV-TH-PK-2016 สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย และ SLCuYV-Y23 (AJ420319.1) สายพันธุ์ที่พบในประเทศจีนตามลำดับ โดยไม่พบความเหมือนกันกับเชื้อ ToLCNDV, TYLCV และ SqLCV ที่มีการรายงานในฐานข้อมูล NCBI ดังนั้นไพรเมอร์ชุดนี้จึงมีความจำเพาะกับเชื้อไวรัส SLCuYV–TH–PK–2016 ที่ต้องการตรวจสอบโดยสามารถตรวจสอบโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส SLCuYV–TH–PK–2016 ในระดับสายพันธุ์ได้อย่างแม่นยำ และมีประสิทธิภาพ

การทดสอบความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา LAMP เปรียบเทียบกับการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค PCR

การตรวจสอบความไวของปฏิกิริยา LAMP ในการตรวจเชื้อ *Squash leaf curl Yunnan virus*–TH–PK–2016 โดยใช้ดีเอ็นเอตั้งต้นที่มีความเข้มข้น

134 ng/µl แล้วนำมาเจือจางเป็น 10 เท่าการทดลองครั้งนี้พบว่า เทคนิค LAMP สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ที่ค่าการเจือจาง 10^{-3} หรือที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอประมาณ 134 pg/µl ในเวลา 1 ชั่วโมง และสามารถตรวจสอบผลด้วยเทคนิค gel electrophoresis (Figure 4A) และตรวจสอบด้วยตาเปล่าหลังจากเติมสารเรืองแสง SYBR Green I (Figure 4B) โดยหลอดที่เกิดปฏิกิริยาได้มากที่สุดพบว่ามีสีเขียวเรืองแสงเกิดขึ้นชัดเจนที่สุดซึ่งพบได้ในที่ความเข้มข้น 134 ng/µl โดยสีที่เกิดลดลงตามค่าการเจือจางของดีเอ็นเอเช่นเดียวกับการดูผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (Figure 4C)

ส่วนวิธี PCR สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ถึงค่าการเจือจางของดีเอ็นเอที่ 10^{-3} หรือที่ความเข้มข้นต่ำสุด 134 pg/µl ได้เช่นกันที่เวลา 2 ชั่วโมง (Figure 4D) แต่ต่างจากการรายงานของ Kuan *et al*. (2010) ซึ่งรายงานว่าเทคนิค LAMP มีความไวในการเกิดปฏิกิริยามากกว่าเทคนิค PCR อยู่ 10 เท่า เมื่อพิจารณาความแตกต่างองค์ประกอบที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อ SLCuYV–TH–PK–2016 ด้วยชุดไพรเมอร์ *AC1* พบว่าปริมาณความเข้มข้นไพรเมอร์ FIP BIP และ F3 B3 ที่ใช้ในการทดลองมีค่า 6.4 µM และ 0.4 µM ตามลำดับ ซึ่งต่างจากการทดลองของ Kuan *et al*. (2010) ที่ใช้ความเข้มข้นไพรเมอร์ FIP BIP และ F3 B3 อยู่ที่ 2.0 µM และ 0.2 µM ตามลำดับ การใช้ปริมาณความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่มากกว่าในการทดลองนี้อาจทำให้โอกาสในการเข้าจับของ F3 B3 ไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบลดลงเพราะมีปริมาณน้อยกว่าความเข้มข้นไพรเมอร์ FIP BIP ซึ่งทำให้ส่งผลต่อการทำปฏิกิริยา LAMP นอกจากนี้ความเข้มข้นสาร Betaine และ $MgSO_4$ ซึ่งมีหน้าที่ช่วยในการทำงานของเอนไซม์ โดยในการทดลองครั้งนี้ใช้ 1 M Betaine และ 5mM $MgSO_4$ ซึ่งต่างจากการทดลองโดย Kuan *et al*. (2010) ที่รายงานว่าความเข้มข้น 0.6 M Betaine และ 6 mM $MgSO_4$ เป็นองค์ประกอบที่เหมาะสมสำหรับการเกิดปฏิกิริยา ทั้งนี้ Banerjee *et al*. (2016) พบว่า ชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบตามบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา เพราะตำแหน่งของ ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มาจากบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันค่า มีค่า GC content ในแต่ละเส้นของไพร-เมอร์ที่อาจส่งผลต่อค่า Melting Temperature (Tm) ทำให้มีผลต่อการเลือกใช้อุณหภูมิสำหรับขั้นตอน annealing เนื่องจากเทคนิค LAMP มีการใช้อุณหภูมิเพียงช่วงเดียวในการเกิดปฏิกิริยา โดยลำดับจำนวน G–C content ของ นิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ และความเข้มข้น $MgSO_4$ มีผลต่อการทำงานของ *Bst* polymerase ในขั้นตอน annealing จากข้อมูลการทดสอบความไวในครั้งนี้ทำให้ทราบว่าการปรับองค์ประกอบของสารต่าง ๆ ที่ทำการทดลองเพื่อตรวจเชื้อ SLCuYV–TH–PK–2016 ด้วยชุดไพรเมอร์ *AC1* สามารถปรับเพื่อพัฒนาเทคนิคนี้ให้มีความไวในการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นได้อีก

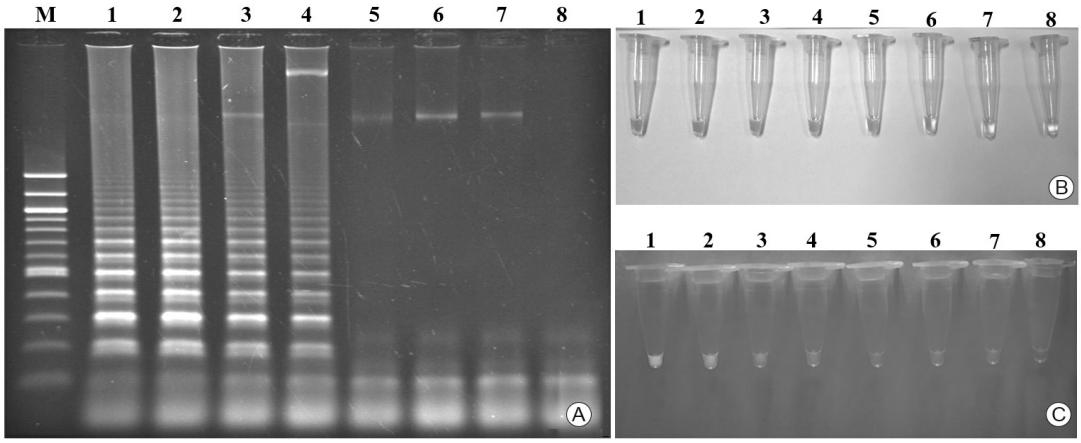

Figure 3 LAMP assay for detection of SLCuYV–TH–PK–2016. Amplified products were analyzed by agarose gel electrophoresis (A), visual inspection with SYBR® Green I safe DNA gel stain (B) and under UV illumination after SYBR Green I use (C). Lane M, DNA marker (100bp DNA Ladder, New England Biolabs® Inc); lane 1 Cus15, lane 2 Cus16, lane 3 CusLL1, lane 4 SLCuYV in pumpkin (positive control), lane 5 TYLCV in tomato, lane 6 healthy pumpkin, lane 7 healthy tomato, lane 8 distilled water (negative control)

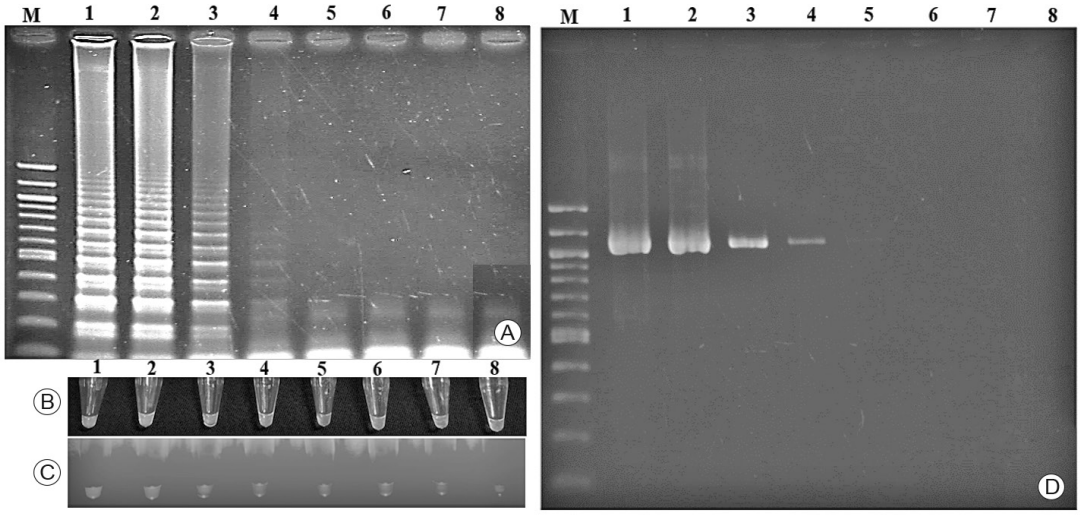

Figure 4 Comparison of sensitivity of LAMP and PCR method using ten fold serial dilutions of DNA sample to amplified products by were analyzed by agarose gel electrophoresis; Lane M, DNA marker (100bp DNA Ladder, New England Biolabs® Inc); lane 1–7: 1, 10^{-1}, 10^{-2},10^{-3},10^{-4},10^{-5} and 10^{-6} dilutions respectively; lane 8 distilled water (negative control). The fluorescence green colored LAMP products by visual inspection with SYBR®stain (B), under UV illumination after SYBR use (C) and PCR detection (D)

สรุป

การพัฒนาเทคนิค LAMP เพื่อตรวจเชื้อ SLCuYV–TH–PK–2016 เชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบหงิกเหลืองในพืชวงศ์แตง โดยการออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณยีน *AC1* ของเชื้อนี้ ในครั้งนี้ประสบความสำเร็จในการตรวจเชื้อ SLCuYV–TH–PK–2016 ได้อย่างจำเพาะ และมีความไวในการตรวจเชื้อโดยมีดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ความเข้มข้นต่ำสุด 134 pg/µl เมื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ LAMP product พบว่าเทคนิค LAMP ที่พัฒนาขึ้นในการทดลองนี้ สามารถตรวจเชื้อ SLCuYV–TH–PK–2016 ได้ในระดับสายพันธุ์ และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับดีเอ็นเอของเชื้อ *Tomato yellow leaf–curl Thailand virus* และพืชอาศัยปลอดโรค เช่น มะเขือเทศ ฟักทอง แตงกวา เป็นต้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2559 และศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่สนับสนุนอุปกรณ์เครื่องมือในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Almasi, M.A., M.A. Ojaghkandi, A. Hemmatabadi, F. Hamidi and S. Aghaei. 2013. Development of Colorimetric Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of the *Tomato yellow leaf curl virus*. J. Plant Pathol. Microbiol. 4(1): 153–158.

Anfoka, G., F.H. Ahmad, M. Abhary and A. Hussein. 2009. Detection and molecular characterization of viruses associated with tomato yellow leaf curl disease in cucurbit crops in Jordan. Plant Pathol. 58: 754–762.

Banerjee, A., S. Roy, S.K. Sharma, S.K. Dutta, S. Chandra and S.V. Ngachan. 2016. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT–LAMP) assay for rapid diagnosis of chilli veinal mottle virus. Arch. Virol. 161(7): 1957–1961.

Flock, R.A. and D. Mayhew. 1981. Squash leaf curl, a new disease of cucurbits in California. Plant Dis. 65: 75–76.

Fukuta, S., Y. Mizukami, A. Ishida, J. Ueda, M. Kanbe, Y. Ishimoto, S. Kato and K. Yoshida. 2003. Detection of *Tomato yellow leaf curl virus* by loop-mediated isothermal amplification reaction. J. Virol. Methods 112: 35–40.

Junpetch, R. 2016. Development of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Technique for the Detection of *Squash leaf curl virus* of Cucurbits in Thailand. MS Thesis, Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)

Kuan, C., M. Wu, Y. Lu and H. Huang. 2010. Rapid detection of *Squash leaf curl virus* by loop–mediated isothermal Amplification. J. Virol. Methods 169: 61–65.

Mansoor, S., S.H. Khan, M. Hussain, N. Mushtaq, Y. Zafar and K.A. Malik. 2000. Evidence that watermelon leaf curl disease in Pakistan is associated with *Tomato leaf curl virus*-India. Plant Dis. 84(1): 102.

Mason, G., M. Rancati and D. Bosco. 2000. The effect of thiamethoxam, a second generation neonicotinoid insecticide, in preventing transmission of tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV) by the whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius). Crop Prot. 19: 473–479.

Mori, Y. and T. Notomi. 2009. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost–effective diagnostic method for infectious diseases. J. Infect. Chemother. 15: 62–69.

Xie, X. and X.P. Zhou. 2003. Molecular characterization of *Squash leaf curl Yunnan virus*, a new begomovirus and evidence for recombination. Arch. Virol. 148: 2047–2054.