โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสใบด่างพริก : การผลิต คุณสมบัติ และการนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัย

Anti–*Pepper mild mottle virus* Polyclonal Antibody : Production, Characteristics and Diagnostic Application

ธีร์วศิษฐ์ แพทย์สมาน[1,2] รัชนี ฮงประยูร[1,2,3,*] และ สิริกุล วะสี[3,4]

Teewasit Phatsaman[1,2] Ratchanee Hongprayoon[1,2,3,*] and Sirikul Wasee[3,4]

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[2] ศูนย์วิทยาการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหาร สถาบันวิทยาการขั้นสูงแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

[3] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[4] ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

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

[2] Center for Advanced Studies for Agriculture and Food, Kasetsart University Institute for Advanced Studies, Kasetsart University, Bangkok 10900 Thailand (CASAF, NRU–KU, Thailand)

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

[4] Tropical Vegetable Research Center, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140 Thailand

รับเรื่อง: มีนาคม 2560 Received: March 2017

รับตีพิมพ์: ตุลาคม 2560 Accepted: October 2017

* Corresponding author: agrrat@ku.ac.th

ABSTRACT: *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) is a plant virus in the genus *Tobamovirus* infecting peppers which are economic plants. The virus can be transmitted from plant to plant mechanically and by seed, causing serious yield loss. Since no chemical control is available therefore screening for disease–free seed by serological assay is recommended for control measure. Production high quality antibody is very important in this case. The objective of this study is to produce a specific polyclonal antibody against PMMoV by using its recombinant coat protein (PMMoV–CP) as an antigen. The virus isolated from Kamphaeng Saen district, Nakhon Pathom Province was used as a template for PMMoV coat protein (PMMoV–CP) gene cloning. The PMMoV–CP gene, 474 bp, was ligated into pQE80–L expression vector and produced the recombinant PMMoV–CP at 17.5 kDa which was then immunized into a New Zealand White rabbit subcutaneously and intramuscularly. The antiserum had been collected weekly for the period of eight weeks. Their titers ranged from 25,600 – 204,800 with the highest titer presented in 8th week. Indirect PTA–ELISA using the antiserum at a dilution 1:1000 could detect PMMoV in the infected leaf saps up to the dilution 1:5,120. Specificity test was performed and the result showed high specificity to five tobamoviruses including PMMoV, *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Odontoglossum ringsot virus* (ORSV), *Tomato mosaic virus* (ToMV) and *Ribgrass mosaic virus*

(RMV), but showed no cross reaction to other viruses tested including *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) in the genus *Tobamovirus*; *Potato virus* Y (PVY), *Chilli veinal mottle virus* (ChiVMV) and *Papaya ringspot virus* (PRSV) in the genus *Potyvirus; Tomato necrotic ring virus* (TNRV), *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) and *Melon yellow spot virus* (MYSV) in the genus *Tospovirus*; *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) in the genus *Begomovirus* and *Cucumber mosaic virus* (CMV) in the genus *Cucumovirus*. Examination of the antiserum reactivity was carried out by comparison with the commercial antibodies from Agdia and the results from every sample were corresponding.

Keywords: Virus coat protein, diagnosis, phytosanitary certification, serological technique, tobamovirus

Agricultural Sci. J. (2017) Vol. 48(3): 403–414 ว. วิทย. กษ. (2560) 48(3): 403–414

บทคัดย่อ

Pepper mild mottle virus (PMMoV) เป็นเชื้อไวรัสในจีนัส *Tobamovirus* มีพริกซึ่งเป็นพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจเป็นพืชอาศัย สามารถถ่ายทอดโรคด้วยวิธีกลโดยน้ำคั้นพืช และผ่านทางเมล็ด ทำความเสียหายต่อผลผลิตพริก อีกทั้งยังไม่มีสารเคมีใดกำจัดเชื้อไวรัสชนิดนี้ การคัดกรองเมล็ดพันธุ์เพื่อให้ปราศจากโรคด้วยวิธีการทางซีรัมวิทยานับเป็นขั้นตอนเบื้องต้นที่จะช่วยควบคุมโรคได้ การผลิตแอนติบอดีที่มีคุณภาพจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ PMMoV โดยใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (PMMoV–CP) เป็นแอนติเจน โดยนำตัวอย่างโรคพริกที่ตรวจพบเชื้อ PMMoV จากอำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม มาใช้เป็นต้นแบบในการโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส ได้ชิ้นยีนขนาด 474 นิวคลีโอไทด์ เพื่อโคลนเข้าสู่พลาสมิดพาหะ pQE–80L expression vector และกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีน พบว่าโปรตีน PMMoV–CP มีน้ำหนัก 17.5 กิโลดาลตัน สกัด PMMoV–CP ให้บริสุทธิ์เพื่อใช้ในการผลิตแอนติซีรัมโดยวิธีฉีดเข้าใต้ผิวหนังและเข้ากล้ามเนื้อขาหลังของกระต่ายพันธุ์ New Zealand White เก็บแอนติซีรัมทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า มีค่าไตเตอร์อยู่ระหว่าง 25,600 – 204,800 โดยมีค่าไตเตอร์สูงสุดในสัปดาห์ที่ 8 เมื่อนำไปเจือจางที่ 1:1,000 และตรวจน้ำคั้นพริกเป็นโรค พบว่ามีความไวในการตรวจที่ระดับการเจือจาง 1:5,120 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมพบว่ามีความจำเพาะกับเชื้อไวรัส 5 ชนิดในจีนัส *Tobamovirus* ได้แก่ PMMoV *Tobacco mosaic virus* (TMV) *Odontoglossum ringsot virus* (ORSV) *Tomato mosaic virus* (ToMV) และ *Ribgrass mosaic virus* (RMV) โดยไม่ทำปฏิกิริยากับไวรัสชนิดอื่นอีก 9 ชนิดที่นำมาทดสอบ คือ *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) ในจีนัส *Tobamovirus*; *Potato virus* Y (PVY), *Chilli veinal mottle virus* (ChiVMV) และ *Papaya ringspot virus* (PRSV) ในจีนัส *Potyvirus; Tomato necrotic ring virus* (TNRV), *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) และ *Melon yellow spot virus* (MYSV) ในจีนัส *Tospovirus*; *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) ในจีนัส *Begomovirus* และ ได้แก่ *Cucumber mosaic virus* (CMV) ในจีนัส *Cucumovirus* การทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจเชื้อ PMMoV โดยใช้แอนติซีรัมที่ผลิตได้เปรียบเทียบกับแอนติบอดีทางการค้าพบว่าให้ผลตรงกันทุกตัวอย่างที่นำมาทดสอบ

คำสำคัญ: โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส, การตรวจวินิจฉัย, การตรวจรับรอง, เทคนิคซีรัมวิทยา, โทบาโมไวรัส

บทนำ

โรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสใบด่างพริก (*Pepper mild mottle virus* หรือ PMMoV) (Sutabutra, 1989) มีรายงานการพบครั้งแรกในสหรัฐอเมริกาในปี ค.ศ. 1952 (Wetter *et al*., 1984) ปัจจุบันพบรายงานการระบาดทั่วโลก เช่น ในทวีปอเมริกาเหนือ ประเทศสหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย ญี่ปุ่น จีน ไต้หวัน ยุโรป และแอฟริกา (Lamb *et al*., 2001) โดยเข้าทำลายทั้งพริกผลใหญ่ ผลเล็ก และพริกประดับ ทำให้พริกแสดงอาการใบด่าง เนื้อใบมีสีเขียวอ่อนสลับเขียวเข้ม รูปร่างบิดเบี้ยวเสียรูป และเส้นใบหงิกงอ ส่วนลักษณะอาการบนผลพริก จะทำให้ผิวขรุขระ ด่าง และมีขนาดผลเล็กกว่าปกติ ทำให้คุณภาพและผลผลิตของพืชลดลง และยังส่งผลต่อการผลิตเมล็ดพันธุ์ทางการค้า ซึ่งไวรัสใบด่างพริกมีพืชอาศัยกว้าง ถ่ายทอดโรคได้ง่ายด้วยวิธีกล มีความเข้มข้นสูงในน้ำคั้นพืช และเป็นเชื้อไวรัสกลุ่มที่มีความทนทานสูงจึงมีโอกาสติดไปโดยการสัมผัสกับพืชที่เป็นโรคหรือดินและซากพืชที่มีการปนเปื้อนเชื้อไวรัสดังกล่าว นอกจากนั้นยังสามารถถ่ายทอดโรคโดยติดไปกับส่วนเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) แต่ไม่มีรายงานของพาหะนำโรค (Zaitlin, 2000) ในปี พ.ศ. 2559 ประเทศไทยส่งออกเมล็ดพันธุ์พริก คิดเป็นมูลค่ามากกว่า 620 ล้านบาท (Thai seed trade association, 2016) ซึ่งติดอันดับ 1 ใน 10 ของเมล็ดพันธุ์ที่มีการส่งออกมากที่สุดของไทย ดังนั้นการนำเข้าและส่งออกเมล็ดพริกเพื่อการค้าจึงมีความเสี่ยงต่อการเข้าทำลายของโรคนี้และเป็นอุปสรรคต่อการผลิตและการส่งออกได้ในอนาคต ซึ่งหากมีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสติดไปกับผลผลิตหรือเมล็ดพันธุ์ที่จะส่งออก นอกจากจะเป็นการลดความน่าเชื่อถือแล้วยังอาจเกิดค่าใช้จ่ายในการตีกลับอีกด้วย เนื่องจากเชื้อไวรัสชนิดนี้เป็นเชื้อไวรัสกักกันในหลายประเทศ ได้แก่ ประเทศในกลุ่มยุโรป สเปน อินเดีย อเมริกา เกาหลีใต้ และญี่ปุ่น เป็นต้น (Department of Agriculture, 2016) ที่ห้ามปนเปื้อนมากับผลผลิตและส่วนขยายพันธุ์ต่าง ๆ ต้องมีการออกใบรับรองพืชปลอดโรคซึ่งเป็นข้อบังคับในประเทศผู้ค้า หน่วยงานที่เกี่ยวข้องในการตรวจสอบโรคต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงในการนำเข้าแอนติบอดีจากต่างประเทศที่มีราคาแพง การผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสดังกล่าวภายในประเทศจึงช่วยลดค่าใช้จ่าย สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบด้วยเทคนิคซีรัมวิทยาและชีวโมเลกุลที่ให้ผลตรวจที่รวดเร็วและแม่นยำ งานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสใบด่างพริก ศึกษาคุณสมบัติของแอนติบอดี และพัฒนาวิธี enzyme–linked immunosorbent assay (ELISA) เพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคใบด่างพริก

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างโรคไวรัสใบด่างพริก (PMMoV)

เก็บตัวอย่างพริกที่แสดงอาการของโรคไวรัสใบด่างพริก ได้แก่ ใบด่างมีสีเขียวอ่อนสลับเขียวเข้ม รูปร่างบิดเบี้ยวเสียรูป และเส้นใบหงิกงอ นอกจากนั้นสามารถสังเกตอาการจากผลพริกซึ่งมีอาการด่าง และมีขนาดผลเล็กกว่าปกติ โดยเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ปลูกในจังหวัดนครปฐม กาญจนบุรี เชียงใหม่ และเชียงราย นำตัวอย่างที่ได้มาตรวจด้วยวิธี Double antibody sandwich ELISA (DAS–ELISA) โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ PMMoV ทางการค้า (Agdia Inc., USA) จากนั้นนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกมาทำการแยกเชื้อไวรัสให้เป็นสายพันธุ์เดี่ยว โดยปลูกเชื้อไวรัสลงบน *Chenopodium amaranticolor* ซึ่งแสดงอาการแผลจุดเฉพาะแห่ง ตัดจุดแผลแต่ละจุดแยกบดใน 0.01 M phosphate buffer อัตราส่วน 1:10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปลูกเชื้อไวรัสจากแต่ละจุดบนใบพริกจินดา *Capsicum annuum* ทำการแยกเชื้อซ้ำอีกครั้งเพื่อ

ให้ได้เชื้อไวรัสบริสุทธิ์ตามวิธีการดังกล่าวข้างต้น นำตัวอย่างที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธี DAS–ELISA เพื่อยืนยันว่าเป็นไวรัส PMMoV จากนั้นนำตัวอย่างพริกที่ผ่านการตรวจสอบแล้วมาทำแห้งโดยใช้สารดูดความชื้นและเก็บไว้ใน 4 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บไว้ใช้งานต่อไป (Anon, 2005)

2. การเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส PMMoV

สกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างพริกโดยใช้ชุดสกัด FavorPrep™ Tissue Total RNA Kit (Favorgen, Taiwan) นำส่วนของ total RNA ที่ได้ไปเตรียม cDNA library ด้วย Superscript™ III One–Step RT–PCR System with Platinum (Invitrogen, USA) และเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน PMMoV–CP โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ใช้ไพรเมอร์ดังนี้ Forward primer คือ 5'–TTT TTG GAT CCA TGG CTT ACA CAG TTT CCA GTG–3' และ Reverse primer คือ 5'–CCT TTA AGC TTT TAA GGA GTT GTA GCC CAG GTG–3' ปฏิกิริยาสำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นยีนมีดังนี้ Total RNA 1 ไมโครลิตร, 2x Reaction mix 25 ไมโครลิตร, Forward primer (10 μM) 1 ไมโครลิตร, Reverse primer (10 μM) 1 ไมโครลิตร, Superscript™ III RT/Platinum Taq Max 2 ไมโครลิตร และ Deionized water (dH_2O) 16 ไมโครลิตร ปริมาตรของปฏิกิริยารวม 50 ไมโครลิตร โดยอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน RT–PCR คือ cDNA synthesis 50 องศาเซลเซียส 30 นาที; Initial denaturation 94 องศาเซลเซียส 2 นาที; Denaturation 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที; Annealing 59 องศาเซลเซียส 30 วินาที Extension 68 องศาเซลเซียส 40 วินาที เริ่มกระบวนการที่ 3–5 ซ้ำอีก 34 รอบ และ Final extension 68 องศาเซลเซียส 5 นาที ลดอุณหภูมิลงมาที่ 16 องศาเซลเซียส ตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ 1.5% agarose gel electrophoresis ใน Tris–borate buffer (TBE) และนำไปย้อมแถบ DNA ด้วย Ethidium bromide ตรวจแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตเปรียบเทียบขนาดของ DNA กับ 100 bp Plus markers (Fermentas, USA)

3. การเชื่อมต่อยีน PMMoV–CP เข้ากับพลาสมิดพาหะ pQE–80L vector และถ่ายเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α

นำ PCR product จากข้อ 2 มาตัดด้วยเอนไซม์ *BamH*I โดยใช้ 10x Fast Digest Buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอพาหะสายผสมปริมาตร 7 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Hind*III ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ น้ำกลั่น (nuclease–free) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำผลผลิตที่ได้เชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ pQE–80L expression vector (Qiagen, USA) โดยใช้อัตราส่วน insert gene ต่อ vector เท่ากับ 3:1 2x ligation buffer 5 ไมโครลิตร และ T4 ligase 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง นำพลาสมิดลูกผสมปริมาตร 10 ไมโครลิตร เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ด้วยวิธีการ heat shock transformation (Sambrook and Russell, 2001) ตรวจสอบการเชื่อมต่อของยีนด้วยวิธี PCR แล้วส่งวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และแปลงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เป็นลำดับกรดอะมิโน ด้วยโปรแกรม ExPASy–Translate tool (http://web.expasy.org/translate/)

4. การสกัดโปรตีน PMMoV–CP บริสุทธิ์

เลี้ยงเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่มียีน PMMoV–CP ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2YT ที่มี Ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 คืน ที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นย้ายลงในอาหารเหลว 2YT ที่ผสม Ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อ

ต่อจนมีค่า OD_{600} เท่ากับ 0.5 เติม IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 mM เลี้ยงเชื้อต่อเป็นเวลาอย่างน้อย 6–8 ชั่วโมง แยกตะกอนเซลล์โดยหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 45 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วย purification buffer (100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris–Cl, 8M Urea, pH 8.0) ที่เติม lysozyme ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราส่วนบัฟเฟอร์ 30 มิลลิลิตรต่อตะกอนเซลล์ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี freeze–thaw แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 45 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนน้ำใสมาผ่านคอลัมน์ Ni–NTA ตามวิธีการของผู้ผลิต เติม Elution Buffer เพื่อชะ PMMoV–CP ออกจากคอลัมน์ โดยเก็บสารละลายโปรตีน fraction ละ 1 มิลลิลิตร จำนวน 8–10 fraction นำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยวิธี SDS–PAGE ตามวิธีการของ Laemmli (1970)

5. การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ PMMoV

นำโปรตีน PMMoV–CP ฉีดกระตุ้นกระต่ายพันธุ์ New Zealand White อายุ 3 เดือน โดยฉีดครั้งแรกด้วยโปรตีนความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับ Complete Freund's Adjuvant (CFA) อัตราส่วน 1:1 โดยฉีดเข้าที่ใต้ผิวหนัง (Subcutaneous injection, SC) ต่อมาฉีดกระตุ้นโดยใช้โปรตีนผสมกับ Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) อัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ฉีดเข้ากล้ามเนื้อขาหลัง (Intramuscular injection, IM) ในสัปดาห์ที่สอง เริ่มเก็บเลือด หลังจากฉีดครั้งแรกไปแล้ว 3 สัปดาห์ และเก็บเลือดต่อไปทุกสัปดาห์จนครบ 8 ครั้ง นำเลือดมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที เพื่อให้เลือดแข็งตัว และแยกส่วนแอนติซีรัมตามวิธีการของ Hongprayoon (2015)

6. วิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ PMMoV

การตรวจวินิจฉัยเชื้อ PMMoV ใช้วิธี indirect plate–trapped antigen enzyme–linked immunosorbent assay (indirect PTA–ELISA) โดยเคลือบ ELISA plate ด้วย rCP ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน coating buffer ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร เปรียบเทียบกับพืชปกติและพืชเป็นโรคที่เป็นแอนติเจนควบคุม (บดด้วย coating buffer อัตราส่วน 1:10) บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นเติม Blocking buffer (PBS + 5% skim milk) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เติมแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อเชื้อ PMMoV (crude antiserum) เจือจาง 1:1,000 ใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วเติม goat anti–rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase (GAR–AP) (Sigma, USA) เจือจาง 1:30,000 ใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แต่ละขั้นตอนก่อนเติมสารชนิดต่อไป ล้าง ELISA plate ด้วย PBST (PBS + 0.05% Tween 20) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ตรวจสอบปฏิกิริยาโดยเติมสับสเตรท *p*–nitrophenyl phosphate ที่เจือจางใน substrate buffer ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที อ่านผลปฏิกิริยาด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร (Hongprayoon, 2015)

7. การตรวจค่าไตเตอร์ (titer) ของแอนติบอดี และความไว (sensitivity) ของวิธีการ

ตรวจค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีที่ผลิตได้โดยเจือจางแอนติซีรัม แบบ 2 เท่า (2–fold dilutions) เริ่มจาก 1:200 ถึง 1:204,800 และให้ทำปฏิกิริยากับโปรตีน PMMoV–CP ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับพืชปกติและพืชเป็นโรคซึ่งเป็นแอนติเจนควบคุม ใช้วิธี indirect PTA–ELISA ตามวิธีการในข้อ 6. ส่วนการตรวจสอบความไวของวิธีการ

โดยนำใบพริกที่เป็นโรคบดใน coating buffer อัตราส่วน 1:20 จากนั้นเจือจาง แบบ 2 เท่า (2–fold dilution) แล้วมาทดสอบกับแอนติซีรัมครั้งที่ 8 ที่ เจือจาง 1:1,000 ด้วยวิธี indirect PTA–ELISA เช่นเดียวกัน (Hongprayoon, 2015)

8. การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ผลิตได้

ทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ผลิตได้ โดยให้ทำปฏิกิริยากับไวรัสสาเหตุโรคพืช จำนวน 14 ชนิด ได้แก่ *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Ribgrass mosaic virus* (RMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Odontoglossum ringsot virus* (ORSV), *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), *Potato virus* Y (PVY), *Chilli veinal mottle virus* (ChiVMV), *Papaya ringspot virus* (PRSV), *Tomato necrotic ring virus* (TNRV), *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV), *Melon yellow spot virus* (MYSV), *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) และ *Cucumber mosaic virus* (CMV) ใช้วิธี indirect PTA–ELISA ตามวิธีการในข้อ 6.

9. การประเมินประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่ผลิตได้โดยตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างพริกที่เก็บจากสภาพแปลงปลูก

นำตัวอย่างพริกสายพันธุ์ Thai Super Hot (*C. annuum*) ที่เก็บจากสภาพแปลงปลูกที่อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 10 ตัวอย่าง โดยสุ่มตัวอย่างที่แสดงอาการใบด่างเขียวอ่อนสลับเขียวเข้ม และตัวอย่างที่ไม่แสดงอาการด่าง มาตรวจหาเชื้อไวรัส PMMoV โดยใช้แอนติบอดีที่ผลิตได้ด้วยวิธี indirect PTA–ELISA ตามวิธีการ Hongprayoon (2015) เปรียบเทียบกับวิธีการ DAS–ELISA โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ PMMoV ทางการค้า (Agdia Inc., USA) ตามคำแนะนำของบริษัท

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเก็บตัวอย่างโรคไวรัสใบด่างพริก (PMMoV)

การเก็บตัวอย่างโรคพริกที่มีลักษณะอาการคล้ายโรคไวรัสใบด่างพริกจากจังหวัดนครปฐม กาญจนบุรี เชียงใหม่ และเชียงราย จำนวนทั้งหมด 70 ตัวอย่าง พบเชื้อไวรัส PMMoV จำนวน 3, 1, 2 และ 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 5%, 20%, 13.33% และ 10% ของตัวอย่างที่เก็บมาในแต่ละพื้นที่ ตามลำดับ (Figure 1) โดยจังหวัดนครปฐมพริกที่ตรวจพบเชื้อ PMMoV ให้ค่าการดูดกลืนแสงจากการตรวจด้วยวิธี DAS–ELISA สูงสุดเท่ากับ 1.318 และแยกได้แผลจุดเฉพาะแห่งบน *C. amaranticolor* หลังจากปลูกเชื้อ 3–4 วัน เมื่อตัดแผลจุดมาปลูกเชื้อไวรัสบนใบพริกจินดา พบว่าแสดงอาการใบด่างสีเขียวอ่อนสลับเขียวเข้ม ซึ่งเป็นอาการของ PMMoV หลังจากปลูกเชื้อไปแล้วประมาณ 7 วัน และให้ผลบวกโดยการตรวจสอบยืนยันด้วยวิธี DAS–ELISA

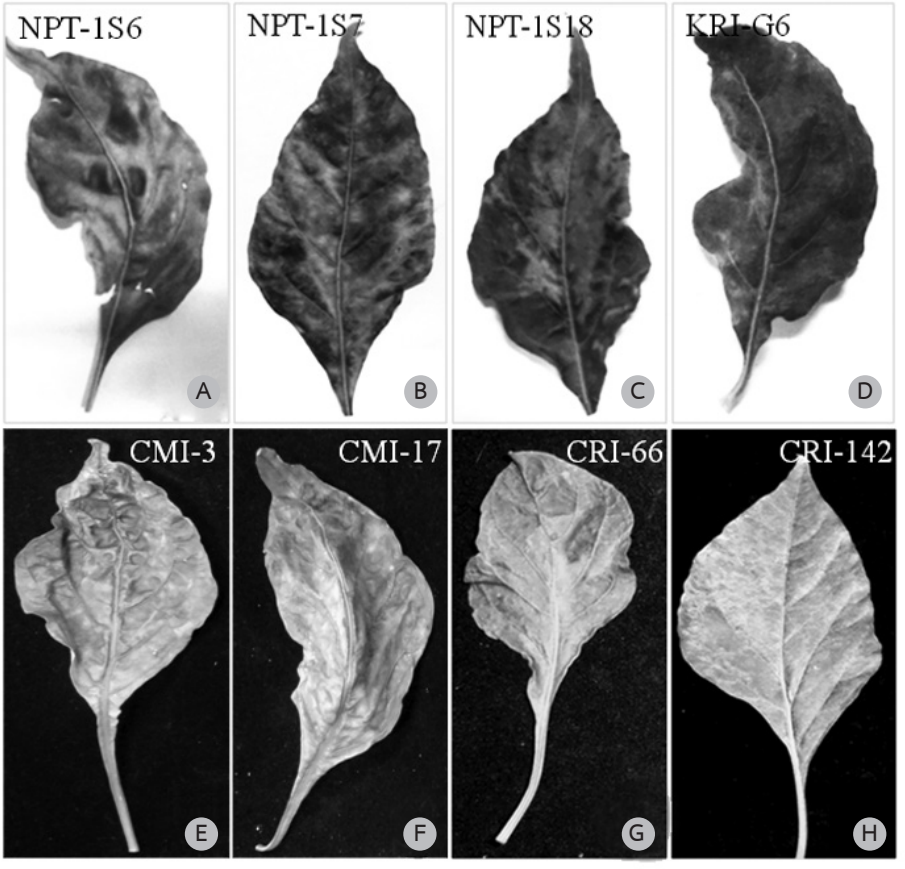

Figure 1 Chlorosis and distertion symptoms on peppers associated with PMMoV from Nakhon Pathom (A–C), Kanchanaburi (D), Chiang Mai (E–F) and Chiang Rai (G–H)

2. การเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส PMMoV

การเพิ่มปริมาณยีน PMMoV–CP ได้ชิ้นยีนที่มีขนาดประมาณ 474 นิวคลีโอไทด์ จากพริก 3 ตัวอย่าง และเมื่อนำตัวอย่าง NPT–1S6 ไปตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน พบว่ายีนมีขนาด 474 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสให้กรดอะมิโนทั้งหมด 157 เรสิดิวส์ ดังนี้ MAYTVSSANQLVYLGSVWADPLELQNLCTSALGNQFQTQQARTTVQQQFSDVWKTIPTATVRFPATGFKVFRYNAVLDSLVSALLGAFDTRNRIIEVENPQNPTTAETLDATRRVDDATVAIRASISNLMNELVRGTGMYNQALFESASGLTWATTP

โดยยีน PMMoV–CP ที่ศึกษามีลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ที่ค่า identity เท่ากับ 100% โดยเหมือนกับข้อมูลจากประเทศจีน (KC020357.1) บราซิล (AB550911.1) และ สเปน (FN594853.1) การวิเคราะห์โปรตีนโดยใช้โปรแกรม CPH models 2.0, Swiss–Pdb viewer 4.10 และโปรแกรม IEBD analysis

resource (Figure 2) ทำให้ทราบเบื้องต้นถึงตำแหน่งที่สามารถเป็นแอนติเจนได้ คือส่วนของโปรตีนที่มีลักษณะเป็น linear epitope ซึ่งมีจำนวน 2 ตำแหน่ง ที่ลำดับกรดอะมิโน 5–11 และ 51–68 โดยอิพิโทปชนิดนี้มีข้อดี คือ จะยังคงรูปร่างเดิมเสมอแม้ว่าโปรตีนจะมีการเสื่อมสภาพ (denatured protein) ทั้งนี้เนื่องจากในขั้นตอนการทำให้โปรตีน PMMoV–CP บริสุทธิ์ จำเป็นต้องใช้บัฟเฟอร์ซึ่งมีองค์ประกอบของยูเรียที่ทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพ แต่การที่อิพิโทปเป็นชนิด linear epitope จะทำให้มั่นใจได้ว่าอิพิโทปดังกล่าวจะยังคงอยู่

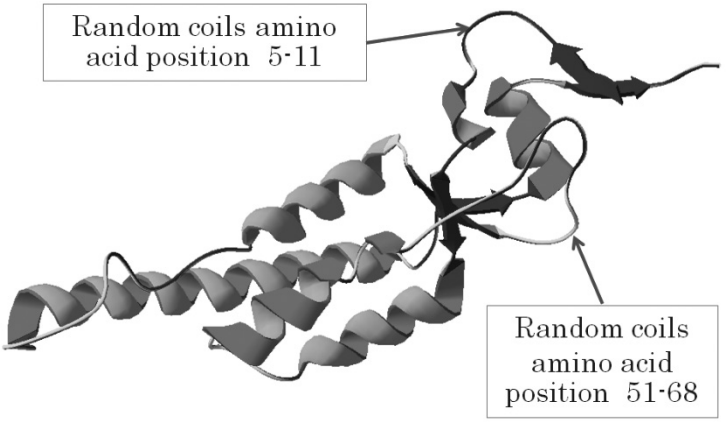

Figure 2 The predicted tertiary structure of recombinant PMMoV coat protein analyzed by SWISS–pdb Viewer shows 78% identity with TMV structure from protein databank. The 2 regions at the amino acid positions 5–11 and 51–68 (in boxes) are predicted to be linear epitopes for immune response for antibody production

3. การสกัดโปรตีน PMMoV–CP บริสุทธิ์

การสกัดโปรตีนโดยวิธี affinity chromatography พบว่า ได้โปรตีนบริสุทธิ์ใน fraction ที่ 2–8 มีความเข้มข้น 0.1342, 1.0615, 1.0745, 0.3470, 0.2132, 0.1008 และ 0.0912 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ผลผลิตโปรตีนรวมทั้งสิ้น 3.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และโปรตีนมีน้ำหนัก 17.5 กิโลดาลตัน

4. วิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ PMMoV

การตรวจวินิจฉัยเชื้อ PMMoV ด้วยวิธี indirect PTA–ELISA พบว่า เมื่อใช้ rCP เป็นแอนติเจน ได้ค่า O.D.405 สูงที่สุด คือ 1.968 เมื่อเปรียบเทียบกับพืชเป็นโรค มีค่าเท่ากับ 1.799 โดยไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับพืชปกติ

5. การตรวจค่าไตเตอร์ (titer) ของแอนติบอดี และความไว (sensitivity) ของวิธีการ

จากการเก็บเลือดเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ตรวจสอบไตเตอร์ของแอนติซีรัมได้ในช่วง 25,600–204,800 โดยมีค่าสูงสุดในสัปดาห์ที่ 8 (AS#8) รองลงมาได้แก่สัปดาห์ที่ 6–7, 2–5 และ 1 โดยมีค่าไตเตอร์เท่ากับ 204,800, 102,400, 51,200 และ 25,600 ตามลำดับ (Figure 3) การวิเคราะห์ความไวในการตรวจสอบโดยวิธี indirect PTA–ELISA พบว่ามีความไวที่ระดับการเจือจาง น้ำคั้นพืชเป็นโรค 1:5,120

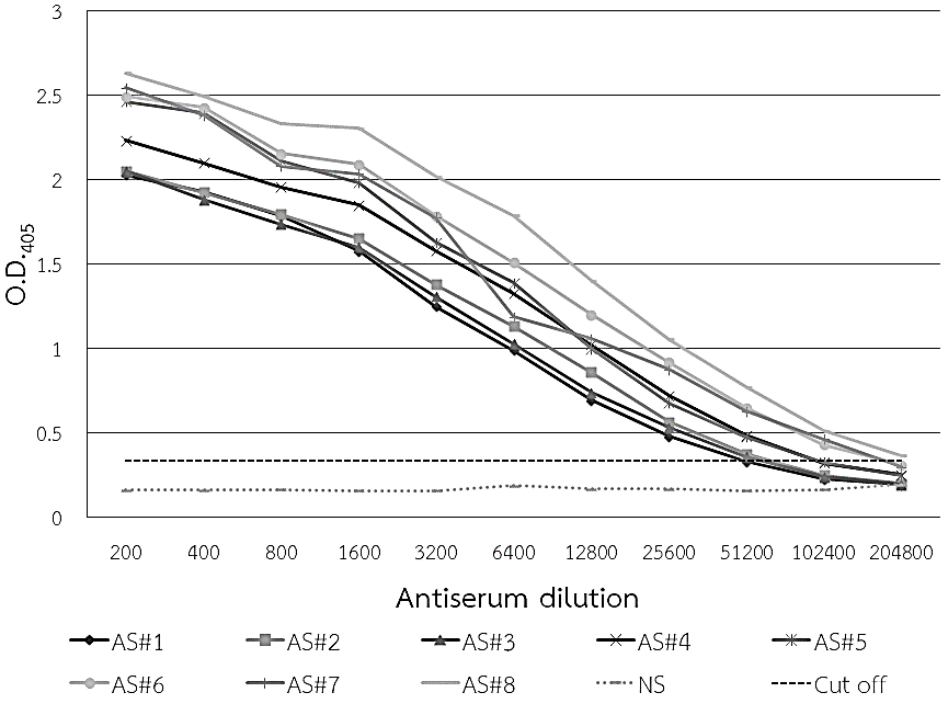

Figure 3 Titration of anti–PMMoV antiserum collected from week 1–8 using PMMoV–CP as an antigen and analyzed by indirect PTA–ELISA

6. การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ผลิตได้

การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมกับเชื้อ 14 ชนิด โดยใช้น้ำคั้นพืชหรือไวรัสบริสุทธิ์เป็นแอนติเจน พบว่าแอนติซีรัมทำปฏิกิริยากับเชื้อ PMMoV โดยมีค่า O.D.$_{405}$ สูงสุด นอกจากนั้นยังทำปฏิกิริยากับเชื้อไวรัสในจีนัสเดียวกันอีก 4 ชนิด คือ TMV, ORSV, ToMV และ RMV แต่ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับไวรัสจีนัสอื่นที่นำมาทดสอบและพืชปกติ (Table 1) เนื่องจากการผลิตแอนติบอดีใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มีการแสดงออกของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเป็นแอนติเจน เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสในจีนัส *Tobamovirus* ทั้ง 6 ชนิดที่นำมาทดสอบมาเปรียบเทียบกัน พบว่า มีความเหมือนกันของเชื้อ PMMoV กับ TMV, ToMV, ORSV, RMV และ CGMMV อยู่ที่ 73.89%, 73.89%, 68.79%, 49.68 และ 36.31 ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาเฉพาะส่วนที่วิเคราะห์จากโปรแกรมคอมพิวเตอร์คาดว่าเป็น linear epitope จำนวน 15 เรสิดิวส์ (ซึ่งจำนวนกรดอะมิโนบริเวณอิพิโทปอาจมีเพียง 4–6 เรสิดิวส์) ในส่วนลำดับกรดอะมิโนที่ 51–58 ของ PMMoV–CP กับเชื้อไวรัสชนิดอื่นดังกล่าวพบว่ามีความเหมือนกับเชื้อ ORSV, TMV, ToMV และ RMV เท่ากับ 66.7, 60, 60 และ 33.3 ตามลำดับ ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาข้ามนี้มีข้อมูลสนับสนุนจากรายงานของ Monia and Kerim (2006) ที่ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ PMMoV แต่พบว่าแอนติบอดีที่ได้ทำปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อไวรัส TMV Keila Maria *et al*. (2002) ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ ToMV พบว่าแอนติบอดีทำปฏิกิริยาข้ามกับ TMV จากรายงานที่กล่าวมาเบื้องต้นนั้นแสดงให้เห็นว่าไวรัสในกลุ่ม *Tobamovirus* นี้ยังคงมีบางอิพิโทปที่เหมือนกันอยู่จึงทำให้แอนติบอดีเกิดปฏิกิริยาข้ามในกลุ่มเดียวกัน อย่างไรก็ตามปริมาณไวรัสในตัวอย่างพืชก็มีส่วนสำคัญ

ต่อค่า $O.D._{405}$ ที่อ่านได้ เนื่องจากตัวอย่าง TMV และ ORSV ที่นำมาทดสอบเป็นไวรัสบริสุทธิ์และมีความเข้มข้นสูง ส่วน ToMV และ RMV เป็นตัวอย่างควบคุมที่จัดซื้อมา ซึ่งโดยปกติจะพบว่ามีปริมาณไวรัสน้อยกว่า ในภาพรวมแม้ว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้ไม่จำเพาะกับ PMMoV เพียงอย่างเดียว แต่การที่มีปฏิกิริยาข้ามกับเชื้ออื่นในจีนัส *Tobamovirus* โดยเฉพาะที่เข้าทำลายพริกได้ จึงเป็นข้อดีในการนำไปใช้เพื่อการคัดกรองเชื้อ PMMoV, TMV, ToMV และ RMV ในการตรวจสอบเบื้องต้นก่อนที่จะนำมาตรวจสอบแยกชนิดของไวรัส ทำให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบ

Table 1 Specificity test of anti–PMMoV antiserum at 1:1,000 dilution against PMMoV–CP and other viruses by Indirect PTA–ELISA

Genus	Viruses species	Antigen/source	$O.D._{405}$	Result
Tobamovirus	PMMoV	positive control/Agdia	1.746 ± 0.010[a]	+
	TMV	purified virus/tobacco	1.670 ± 0.023	+
	RMV	positive control/Agdia	0.465 ± 0.025	+
	ToMV	positive control/Agdia	0.459 ± 0.004	+
	ORSV	purified virus/orchid	1.452 ± 0.007	+
	CGMMV	purified virus/cucumber	0.189 ± 0.001	–
Potyvirus	PVY	plant sap/potato	0.207 ± 0.002	–
	ChiVMV	plant sap/pepper	0.183 ± 0.003	–
	PRSV	plant sap/papaya	0.193 ± 0.002	–
Tospovirus	TNRV	plant sap/pepper	0.190 ± 0.001	–
	WSMoV	plant sap/cucumber	0.184 ± 0.001	–
	MYSV	plant sap/cucumber	0.210 ± 0.002	–
Begomovirus	ToLCNDV	plant sap/cucumber	0.182 ± 0.002	–
Cucumovirus	CMV	plant sap/pepper	0.183 ± 0.002	–
Negative control		plant sap/pepper	0.142 ± 0.002	–

[a] The absorbance value was the mean value obtained from three independent assays at 60 min after adding the substrate at 37°C

7. การประเมินประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่ผลิตได้โดยตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างพริกที่เก็บจากสภาพแปลงปลูก

การตรวจตัวอย่างพริกจำนวน 10 ตัวอย่าง โดยวิธี indirect PTA–ELISA ตรวจพบเชื้อ PMMoV 5 ตัวอย่าง และไม่พบเชื้อ PMMoV จำนวน 5 ตัวอย่าง ซึ่งให้ผลตรงกับการตรวจโดยใช้แอนติบอดีทางการค้า (Table 2) ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพที่ดีใกล้เคียงกับทางการค้า

Table 2 Detection of PMMoV in plant disease samples collected from Nakhon Pathom province by Indirect PTA–ELISA using the produced antiserum at 1:1,000 compared to DAS–ELISA using the commercial antibodies (Agdia, Inc., USA)

Sample	Result/O.D.$_{405}$	
	Indirect PTA–ELISA[a]	DAS–ELISA[a]
Thai Super Hot 1	+/2.080	+/2.997
Thai Super Hot 2	–/0.174	–/0.157
Thai Super Hot 3	+/2.433	+/3.023
Thai Super Hot 4	+/1.741	+/2.266
Thai Super Hot 5	–/0.173	–/0.190
Thai Super Hot 6	–/0.178	–/0.169
Thai Super Hot 7	+/2.221	+/3.082
Thai Super Hot 8	+/2.206	+/3.053
Thai Super Hot 9	–/0.175	–/0.161
Thai Super Hot 10	+/2.310	+/3.097

[a] The absorbance value was the mean value obtained from three independent assays at 60 min after adding the substrate at 37°C

สรุป

งานวิจัยนี้ได้ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ PMMoV โดยใช้โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสเป็นแอนติเจน โดยการโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสเข้าสู่พลาสมิดพาหะ pQE–80L expression vector ยีนมีขนาด 474 นิวคลีโอไทด์ และแปลรหัสให้กรดอะมิโน 157 เรสิดิวส์ น้ำหนักโมเลกุล 17.5 กิโลดาลตัน การวิเคราะห์ลำดับกรดนิวคลิโอไทด์และกรดอะมิโนเปรียบเทียบกับที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนกันที่ค่า identity 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปใช้เป็นแอนติเจนในการผลิตแอนติบอดีและเก็บแอนติซีรัมจำนวน 8 สัปดาห์ พบว่ามีค่าไตเตอร์อยู่ในช่วง 25,600 – 204,800 มีความไวในการตรวจสอบน้ำคั้นพืชเป็นโรคที่ระดับการเจือจาง 1:5,120 แอนติซีรัมมีความจำเพาะกับเชื้อไวรัสในจีนัส *Tobamovirus* 5 ชนิดที่นำมาทดสอบ ได้แก่ PMMoV, TMV, ORSV, ToMV และ RMV โดยไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับไวรัสในจีนัสอื่น ๆ และพืชปกติ ถึงแม้ว่าแอนติบอดีจะไม่จำเพาะต่อ PMMoV ชนิดเดียวตามเป้าหมาย แต่การที่แอนติบอดีมีความจำเพาะต่อเชื้อในจีนัส *Tobamovirus* โดยเฉพาะที่เข้าทำลายพริกถึง 4 ชนิด และให้ผลการตรวจใกล้เคียงกับแอนติบอดีทางการค้า แสดงว่าแอนติบอดีมีประสิทธิภาพที่จะใช้ในการตรวจคัดกรองตัวอย่างพริกที่อาจได้รับเชื้อในจีนัสนี้ได้ ซึ่งในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการผลิตแอนติบอดีที่สามารถตรวจ PMMoV, ToMV และ RMV ได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก ศูนย์วิทยาการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหารมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภายใต้ โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และ ทุนอุดหนุนวิจัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตรที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Anon. 2005. Management of plant pathogen collection. Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, Canberra, Australia. 126 p.

Department of Agriculture. 2016. Pest categorisation of pests associated with species worldwide. Available Source: http://www.doa.go.th/plprotect/index.php/8-2016-02-11-07-20-29/23-2016-02-12-04-10-34, March 4, 2017.

Hongprayoon, R. 2015. Serological techniques for plant disease diagnosis. Phet Kasem Printing Group, Nakhon Pathom, Thailand. 88 p. (in Thai)

Keila Maria, R.D., L.H. Gomes, F.G. Andrino, G.A. Leal Jr., F.H. Bicudo da Silva, J.A. Rizzato Paschoal, A.M. Brancalion Giacomelli and F.C. Almeida Tavares. 2002. Identification of *Tomato mosaic virus* (ToMV) tobamovirus using monoclonal antibodies. Sci. Agric. 59(1) : 107–112.

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

Lamb, E.M., S. Atkins, K.D. Schuler and P.D. Roberts. 2001. *Pepper mild mottle virus*. University of Florida, IFAS Extension Bull. HS–808.

Monia, M.H. and K. Ezzaier. 2006. Biological, serological, and molecular characterization of *pepper mild mottle virus* (PMMoV) in Tunisia. Tunis. J. Plant Prot. 1(1) : 1–12.

Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual vols. 1, 2 and 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2100 p.

Sutabutra, T. 1989. Virus and virus–like diseases of plants in Thailand. Funny Publishing, Bangkok, Thailand. 130 p. (in Thai)

Thai seed trade association (THASTA). 2016. The volume and value of exports of controlled seed for commercial purposes 2016. Available Source: http://www.thasta.com/web/index.php/2016-05-29-01-47-24/2016-05-29-01-48-39, March 6, 2017.

Wetter, C., D. Conti, R. Altscuh, R. Tabillion and M.H.V. van Regenmortel. 1984. *Pepper mild mottle virus*, a tobamovirus infecting pepper cultivars in Sicily. J. Phytopathol. 74: 405–410.

Zaitlin, M. 2000. *Tobacco mosaic virus*. CMI/AAB *Description* of *plant viruses*, No.370. Available Source: http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=370, September, 2013.