

การผลิตโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคลูกผสมเพื่อการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี
ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Tomato leaf curl New Delhi virus* –
[Thailand:Kanchanaburi:Cucumber:2012]

Production of Recombinant Coat Protein for the Generation of Specific
Polyclonal Antibody Against *Tomato leaf curl New Delhi virus* –
[Thailand:Kanchanaburi:Cucumber:2012]

สรราชัย จันทะจร^{1,2} และ รัชณี ฮงประยูร^{1,2,3,*}
Sanchai Chantajorn^{1,2} and Ratchanee Hongprayoon^{1,2,3,*}

¹ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

² ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ กรุงเทพฯ

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 (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok, Thailand.

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

รับเรื่อง: พฤษภาคม 2560 Received: May 2017

รับตีพิมพ์: พฤศจิกายน 2560 Accepted: November 2017

* Corresponding author: agrat@ku.ac.th

ABSTRACT: *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) causes curling leaf disease of cucumber, an economic plant in Thailand. Serological detection of this disease requires good quality antibody. The objective of this research is to produce anti-ToLCNDV antibody against recombinant coat protein (rCP) antigen of ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12] isolated from curling leaf cucumber sample in Kanchanaburi province. The CP gene was cloned and ligated into a pQE-80L expression vector. After inducing gene expression, the rCP inclusion body form was obtained and required denaturing condition for protein extraction and purification by Ni-NTA column chromatography. Based on sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis analysis, the rCPs showed the molecular weight of 31 kDa which was further used as an antigen for rabbit immunization. The antiserum had been collected started from the 5th week and continued weekly for 14 weeks. The highest antibody titre appeared in 15th week after the first immunization, at 102,400. Determination of antibody specificity was performed by indirect plate trapped antigen enzyme-linked immunosorbent assay. The result showed that the antibody was specific to native ToLCNDV however it cross-reacted with *Tomato leaf curl virus* (TLCV) and *African cassava mosaic virus* (ACMV) which contained amino acid similarity at 76.95% and 76.95%, respectively. Since no report of the infection of TLCV and ACMV in Cucurbitaceae therefore the produced antiserum



could be used for preliminary screening of ToLCNDV infection in cucurbits and ACMV in cassava. Nevertheless we do not recommend the use of this antiserum for the detection of TLCV in tomato due to the host range property of tomato for ToLCNDV.

Keywords: Cucumber, begomovirus, gene cloning, antibody, virus detection

Agricultural Sci. J. (2017) Vol. 48(3): 415–429

ว. วิทย. กษ. (2560) 48(3): 415–429

บทคัดย่อ

Tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV) เป็นเชื้อไวรัสในสกุล *Begomovirus* ที่เป็นสาเหตุโรคใบหงิกของแตงกวาซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย การตรวจวินิจฉัยโรคโดยเทคนิคซีรัมวิทยาจำเป็นต้องอาศัยแอนติบอดีที่มีคุณภาพ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการผลิตแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อเชื้อ ToLCNDV โดยใช้โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคลูกผสมของเชื้อ ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12] จากตัวอย่างแตงกวาใบหงิก จังหวัดกาญจนบุรี เป็นแอนติเจน โดยโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคและนำมาเชื่อมต่อกับ pQE-80L expression vector หลังจากชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีน พบว่า โปรตีนลูกผสมอยู่ในรูปของ inclusion body ซึ่งต้องใช้การสกัดโปรตีนในสภาพ denaturing condition และทำให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column chromatography การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 31 kDa และได้ใช้เป็นแอนติเจนในการฉีดกระต่าย เริ่มเก็บเลือดในสัปดาห์ที่ 5 และเก็บเลือดทุกสัปดาห์จำนวน 14 ครั้ง พบว่าค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมสูงสุดในสัปดาห์ที่ 15 หลังจากการฉีดครั้งแรก คือ 102,400 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมด้วยวิธี indirect plate trapped antigen enzyme-linked immunosorbent assay พบว่าแอนติซีรัมทำปฏิกิริยาได้กับเชื้อ ToLCNDV ในธรรมชาติ และเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ *Tomato leaf curl virus* (TLCV)

และ *African cassava mosaic virus* (ACMV) ซึ่งมีความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนที่ 76.95 และ 76.95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่เนื่องจากไม่มีรายงานว่าเป็นเชื้อไวรัส TLCV และ ACMV มีพีชวงค์แต่งเป็นพีชอาศัย ดังนั้น แอนติซีรัมที่ผลิตได้สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบเบื้องต้นของเชื้อ ToLCNDV ในพีชวงค์แต่งและ ACMV ในมันสำปะหลังได้ แต่ไม่แนะนำให้ใช้ตรวจสอบเชื้อ TLCV ในมะเขือเทศเนื่องจากมะเขือเทศเป็นพืชอาศัยของเชื้อ ToLCNDV เช่นเดียวกัน

คำสำคัญ: แตงกวา, เบโกโมไวรัส, การโคลนยีนแอนติบอดี, การตรวจสอบไวรัส

บทนำ

แตงกวาเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ทั้งการผลิตเพื่อบริโภคผลสดและการผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออก พบว่าโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสและสร้างความเสียหายให้กับแตงกวาได้มาก คือ โรคใบหงิกของแตงกวาที่เกิดจากเชื้อไวรัสในสกุลเบโกโมไวรัส (*Begomovirus*) โดยมีแมลงหวี่ขาวยเป็นพาหะ อนุภาคไวรัสมีลักษณะเป็นแบบทรงกลมคู่ (icosahedral twinned particles) เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 18–22 นาโนเมตร (Böttcher *et al.*, 2004) มีจีโนมเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวลักษณะเป็นวง (circular single-stranded DNA) เบโกโมไวรัสมีจีโนม 2 แบบคือ monopartite ซึ่งมีส่วนของ DNA-A เพียงอย่างเดียว และ bipartite ซึ่งประกอบด้วยส่วนของ DNA-A

และ DNA-B โดย Chiemsombat *et al.* (1996) รายงานการพบเบโกโมไวรัสในพืชวงศ์แตง เช่น ฟักทอง บวบเหลี่ยม แตงกวา น้ำเต้า ด้วยการใช้อนุภาคตัวตรวจ (DNA probe) และเทคนิคดอท บลอต ไฮบริไดเซชัน (Dot blot hybridization) โดยใช้ DNA probe ที่ผลิตจากดีเอ็นเอของเบโกโมไวรัสสาเหตุโรคใบหงิกเหลืองของมะเขือเทศ Ito *et al.* (2008) รายงานการค้นพบเชื้อเบโกโมไวรัสจากตัวอย่างแตงกวาที่แสดงอาการใบเหลือง (yellow leaf) ในจังหวัดนครปฐมและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนมส่วนของ DNA-A และ DNA-B และตั้งชื่อเชื้อเบโกโมไวรัสชนิดนี้ว่า ToLCNDV-[TH:Cuc:06] ต่อมา Kositsakulchai *et al.* (2013) รายงานการสำรวจโรคไวรัสในพืชวงศ์แตงในพื้นที่ 8 จังหวัด ของประเทศไทย คือ กาญจนบุรี ราชบุรี นครปฐม สุพรรณบุรี พระนครศรีอยุธยา สกลนคร ขอนแก่น และ เชียงใหม่ พบว่าแปลงปลูกแตงกวาที่มีการระบาดของแมลงหิวข้าว ใบแตงกวาจะแสดงลักษณะอาการที่หลากหลาย เช่น ใบหงิก (curling leaf) ใบจุดเหลือง (yellow spot leaf) และ ใบเหลือง ซึ่งเป็นลักษณะอาการของเชื้อเบโกโมไวรัส และยังไม่ได้ทำการพิสูจน์ชนิดของเชื้อเบโกโมไวรัสที่เข้าทำลาย พบว่าตัวอย่างแตงกวาจำนวน 60 เปอร์เซ็นต์ จากแปลงปลูกที่มีการระบาดของแมลงหิวข้าว ต่อมา Chantajorn and Hongprayoon (2017) รายงานการพบเชื้อเบโกโมไวรัสโดยการตรวจสอบด้วยวิธีการ PCR จากตัวอย่างแตงกวาที่แสดงอาการใบหงิก ใบจุดเหลือง และใบเหลือง ในจังหวัดกาญจนบุรี โดยมีลักษณะอาการที่คล้ายคลึงกับรายงานการสำรวจของ Kositsakulchai *et al.* (2013) จากนั้นวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนมส่วนของ DNA-A และ DNA-B ของเชื้อเบโกโมไวรัสจากตัวอย่างแตงกวาที่แสดงอาการใบหงิกและตั้งชื่อเชื้อเบโกโมไวรัสชนิดนี้ว่า ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12]

การผลิตแอนติบอดีเพื่อใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสในสกุล *Begomovirus* ในประเทศไทย พบว่ามีการผลิต

แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อเบโกโมไวรัสโดย Seepiban (2002) รายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคลูกผสมของเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ (*Tomato yellow leaf curl virus: TYLCV*) เป็นแอนติเจน ซึ่งแอนติบอดีจากไฮบริโดมาโคลน M1 มีความจำเพาะกับเชื้อ TYLCV และจากโคลน D2 สามารถทำปฏิกิริยาได้กับเชื้อเบโกโมไวรัสจากตัวอย่างพืชที่แสดงอาการใบหงิกเหลือง เช่น แตงกวา ฟัก บวบ ฟักทอง ตำลึง และขี้กาขาว โดยพืชที่นำมาทดสอบยังไม่ได้มีรายงานการพิสูจน์ชนิดของเชื้อเบโกโมไวรัสที่เข้าทำลาย ต่อมา Saepaisal and Chowpongpan (2015) รายงานการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสใบต่างเหลืองมะเขือเปราะ (*Eggplant yellow mosaic virus: EYMV*) โดยใช้โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคลูกผสมเป็นแอนติเจน ซึ่งแอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะกับเชื้อ EYMV และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อเบโกโมไวรัสชนิดอื่นที่นำมาทดสอบ ส่วนการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ ToLCNDV ที่เข้าทำลายพืชวงศ์แตง ยังไม่เคยมีการรายงานในประเทศไทย อย่างไรก็ตามการวินิจฉัยเชื้อ ToLCNDV จากลักษณะอาการของแตงกวาที่พบในสภาพแปลงปลูกไม่สามารถระบุชนิดของไวรัสได้เนื่องจากอาการที่พบในธรรมชาติมีหลายอาการ ถ้ามีเชื้อไวรัสชนิดอื่นเข้าทำลายร่วมด้วย (mixed infection) จะยิ่งทำให้ลักษณะอาการของพืชมีความหลากหลายมากขึ้น จึงควรหาวิธีการตรวจวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพเพื่อนำไปใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ ToLCNDV ได้อย่างถูกต้องรวมทั้งใช้ในการตรวจสอบพันธุ์พืชที่ต้านทานโรคในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการผลิตโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคลูกผสมของเชื้อ ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12] และใช้เป็นแอนติเจนในการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองเพื่อผลิตแอนติซีรัมที่จำเพาะ รวมทั้งศึกษาคุณสมบัติของแอนติบอดีในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ ToLCNDV ต่อไป



อุปกรณ์และวิธีการ

1. การโคลนยีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12]

นำจีโนมในส่วนของ DNA-A ของเชื้อ ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12] (accession no. KU992383) ที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pQE-80L expression vector (Qiagen, USA) จากงานวิจัยของ Chantajorn and Hongprayoon (2017) มาเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (coat protein gene, CP gene) ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ CP gene ประกอบด้วย ToLCNDV-CP-F : 5' ACATAGGATCCATGGCGAAGCGACCAG 3' และ ToLCNDV-CP-R : 5' GGCCGAAGCTTTT AATTTGTTACCGAATCATAGAAATAG 3' ซึ่งออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ DNA-A ของเชื้อ ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12] โดยใช้โปรแกรม FastPCR (Kalendar, 2005) และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (ขีดเส้นใต้) ของ BamHI (GGATCC) และ HindIII (AAGCTT) โดยกระบวนการ PCR เริ่มจากขั้นตอน pre-denaturation 94 องศาเซลเซียส 3 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาจำนวน 30 รอบ แต่ละรอบประกอบด้วยขั้นตอนต่อไปนี denaturation 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที, annealing 55 องศาเซลเซียส 45 วินาที และ extension 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที ตามด้วย final extension 72 องศาเซลเซียส 7 นาที หยุดปฏิกิริยาที่ 16 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นตรวจสอบ PCR product โดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis ใน Tris borate buffer (TBE) และนำไปย้อมแถบ DNA ด้วย ethidium bromide ตรวจสอบแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) เปรียบเทียบขนาดของ PCR product กับ 100 bp Plus DNA ladder (Fermentas, USA) โดยขนาดของ PCR product

ที่ต้องการ คือ 771 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดของ full CP gene

2. การสร้างดีเอ็นเอสายผสมของ recombinant coat protein (rCP) gene

นำผลผลิตดีเอ็นเอของ CP gene มาสกัดให้บริสุทธิ์ด้วย HiYield™Gel/PCR Fragment Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan) และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ BamHI และ HindIII นำพลาสมิด pQE-80L ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันมาเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase (Invitrogen, USA) ตามวิธีการของบริษัทผู้ผลิต จากนั้นจึงนำชิ้นยีนที่เชื่อมต่อกับ pQE-80L vector ไปถ่ายฝากให้กับเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธีการ heat shock (Sambrook and Russel, 1989) และคัดเลือก transformant ที่ได้บนอาหาร LB agar ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และนำ transformant ที่ได้มาตรวจหาชิ้นยีนด้วยวิธี PCR เลือกโคลนที่ให้ผลเป็น positive ไปวิเคราะห์ลำดับเบสและเหนี่ยวนำให้มีการสร้าง rCP ในขั้นตอนต่อไป

3. การวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของ rCP ของเชื้อ ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12]

นำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของ rCP ของเชื้อ ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12] ไปวิเคราะห์สูตรโมเลกุลของโปรตีน ขนาดโมเลกุล ค่า isoelectric point (pI) และค่าเฉลี่ยของคุณสมบัติการละลายน้ำของโปรตีน (average of hydrophobicity) ด้วยโปรแกรม ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) และวิเคราะห์คุณสมบัติการละลายน้ำของโปรตีนด้วยโปรแกรม ProtScale (<http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>) โดยใช้วิธีการของ Kyte and Doolittle (1982)

4. การแสดงออกของยีนและการเตรียม rCP บริสุทธิ์

เลี้ยงเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่ได้รับการถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของ pQE-80L expression vector และ CP gene ของเชื้อ ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12] ในอาหาร 2YT ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่เติมแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเซลล์ตั้งต้น (starter) นำเซลล์ตั้งต้นไปปลูกเชื้อลงในอาหาร 2xYT ที่มีแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 250 มิลลิลิตรต่อฟลาस्क จำนวน 4 ฟลาस्क ในอัตราส่วน 1:20 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เติม IPTG ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 mM และเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง rCP เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทั้งอาหารเลี้ยงเซลล์ละลายตะกอนเซลล์ด้วย Tris buffer pH 8.0 (non-denaturing buffer) ในปริมาตร 8 มิลลิลิตรต่อ 1 กรัม (น้ำหนักเปียก) ของตะกอนเชื้อ *E. coli* ทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี freeze/thaw โดยใช้ไนโตรเจนเหลวในการแช่แข็งเซลล์ ปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที เก็บส่วนน้ำใส (ส่วนที่ 1) นำตะกอนเซลล์มาละลายโปรตีนด้วย 8 M Urea buffer pH 8.0 (denaturing buffer) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที เก็บส่วนน้ำใส (ส่วนที่ 2) นำส่วนน้ำใสส่วนที่ 2 ไปไหลผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ Ni-NTA resin (Qiagen, USA) โดยทำตามวิธีการของบริษัทผู้ผลิต และใช้ระบบบัฟเฟอร์แบบ denaturing condition คำนวณความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้วิธี Bradford protein assay (Bradford, 1976) และตรวจสอบโปรตีนที่แยกบริสุทธิ์ด้วยวิธีการ sodium

dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยใช้ 12% separating gel และ 6% stacking gel (Laemmli, 1970)

5. การฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง

ใช้กระต่ายพันธุ์ New Zealand White อายุ 3 เดือน โดยฉีด rCP ของเชื้อ ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12] ที่ได้ออไลซ์ในบัฟเฟอร์ PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง ครั้งแรกผสมกับ Complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และฉีดครั้งที่ 2 หลังจากฉีดครั้งแรกนาน 1 เดือน โดยผสมกับ Incomplete Freund's adjuvant ในอัตราส่วนเดิม เริ่มเก็บเลือดจากใบหูในสัปดาห์ที่ 5 และเก็บทุกสัปดาห์จนครบ 14 ครั้ง

6. การตรวจวัดค่าไตเตอร์ของแอนติซีรั่ม

ตรวจวัดค่าไตเตอร์ของแอนติซีรั่มด้วยวิธี Indirect plate trapped antigen - ELISA (indirect PTA-ELISA) ดัดแปลงจากวิธีการของ Clark and Adam (1977) โดยเคลือบหลุม ELISA plate ด้วย rCP ของเชื้อ ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12] ใน coating buffer ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ล้าง ELISA plate ด้วยบัฟเฟอร์ PBS-T 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติม 5% skim milk (blocking buffer) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้าง ELISA plate ด้วยบัฟเฟอร์ PBS-T เช่นเดิม แอนติซีรั่มที่เจือจาง 2 เท่า (2-fold dilutions) จำนวน 12 หลอด เริ่มจาก 1:200 จนถึง 1:409,600 ใน blocking buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง plate ด้วยบัฟเฟอร์ PBS-T จากนั้นเติม goat



anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase ที่เจือจางใน blocking buffer อัตราส่วน 1:30,000 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง plate อีกครั้งและเติมสารละลาย p-nitrophenyl phosphate (PNPP) 1 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตรใน substrate buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA reader (Multiskan EX, Finland) เลือกแอนติบอดี ครั้งที่ทำให้ค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ rCP สูงสุดเพื่อนำไปทดลองในขั้นต่อไป

7. การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดี

ใช้แอนติบอดีในสัปดาห์ที่ 15 หลังจากการฉีด ครั้งแรก ที่เจือจาง 1:1000 นำมาทดสอบกับตัวอย่าง แอนติเจนที่นำมาทดสอบมีทั้งหมด 26 ชนิด คือ *Papaya ring spot virus* (PRSV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Cucumber mosaic virus serogroup I* (CMV I), *Cucumber mosaic virus serogroup II* (CMV II), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Groundnut ringspot virus* and *Tomato chlorotic spot virus* (GRSV/TCSV), *Impatiens necrotic spot virus* (INSV), *Watermelon silver mottle virus* and *groundnut bud necrosis virus* (WSMoV/GBNV), *Capsicum chlorosis virus* (CaCV), *Iris yellow spot virus* (IYSV), *Melon necrotic spot virus* (MNSV), *Cowpea mosaic virus* (CPMV) และ *Squash mosaic virus* (SqMV) จากบริษัท (Agdia, USA), *African cassava mosaic virus* (ACMV), *Indian cassava mosaic virus* (ICMV), *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV), *Squash leaf curl virus* (SLCV), *Tomato leaf*

curl virus (TLCV), *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) และ *Tomato yellow leaf curl Thailand virus* (TYLCVTH) จากบริษัท (DSMZ, Germany), เชื้อไวรัสบริสุทธิ์ *Potato virus Y* (PVY), *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV), *Tobacco mosaic virus* (TMV) และใบพืชที่มีเชื้อไวรัส *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) ที่มีในห้องปฏิบัติการ นำมาเจือจางด้วย coating buffer ตามวิธีการของบริษัทผู้ผลิต สำหรับตัวอย่างที่ซื้อจากบริษัท สำหรับเชื้อไวรัสบริสุทธิ์ใช้ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และบดตัวอย่างพืชที่มีเชื้อไวรัสในอัตราส่วน 1:10 กับ coating buffer และนำมาเคลือบหลุม ELISA plate ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ล้าง ELISA plate ด้วยบัฟเฟอร์ PBS-T ปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติม blocking buffer ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้าง ELISA plate เช่นเดิม เติมแอนติบอดีที่เจือจางใน blocking buffer อัตราส่วน 1:1000 และทำตามวิธีการในข้อ 6. และใช้พืชปกติ 5 ชนิด คือ มันสำปะหลัง พริกแดง กวาง มะละกอ ยาสูบ เป็น negative control ใช้ rCP และน้ำคั้นตัวอย่างแดงกวางที่มีเชื้อ ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12] เป็น positive control

8. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนของ CP gene ของเชื้อ ToLCNDV-[TH:KR:Cu: 12] กับเชื้อเบโกโมไวรัส 7 ชนิด ที่นำมาทดสอบความจำเพาะทางซีรัมวิทยา

วิเคราะห์ข้อมูลความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนในส่วนของ CP gene ของเชื้อ ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12] (KU992383), *Tomato leaf curl virus*: TLCV (KP698315), *Squash leaf curl virus*: SLCV(AF256203), *Tomato yellow Leaf Curl Virus*:

TYLCV (AM409201), *Tomato yellow leaf curl virus*–[Thailand]: TYLCVTH (AM156863), *African cassava mosaic virus*: ACMV (HE814065), *Indian cassava mosaic virus*: ICMV (AJ314739) และ *Sri Lankan cassava mosaic virus*: SLCMV (KR611577) ด้วยโปรแกรม Clustal Omega version 1.2.1 ([http://](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/)

www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/), GENEDOC version 2.6.0.2 (<http://genedoc.software.informer.com/2.6/>) และโปรแกรม MEGA5 version 5.1 (<http://www.megasoftware.net/>) โดยวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Neighbor joining (NJ) method (Saitou and Nei, 1987)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การโคลนยีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ ToLCNDV–[TH:KR:Cu:12] และการสร้างดีเอ็นเอสายผสมของ rCP gene

ยีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ ToLCNDV–[TH:KR:Cu:12] ที่โคลนได้มีความยาว 771 นิวคลีโอไทด์ เมื่อถอดรหัสเป็นโปรตีนจะมีความยาวของกรดอะมิโน

เท่ากับ 256 residues นำยีนดังกล่าวมาสร้างดีเอ็นเอสายผสมของ CP gene และ pQE–80L expression vector เมื่อชักนำให้มีการแสดงออกของยีน พบว่าโปรตีนที่ผลิตได้ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 256 residues รวมกับกรดอะมิโนจำนวน 12 residues จาก pQE–80L expression vector (Figure 1) จึงทำให้โปรตีนลูกผสมนี้มีกรดอะมิโนเท่ากับ 268 residues (Figure 2)

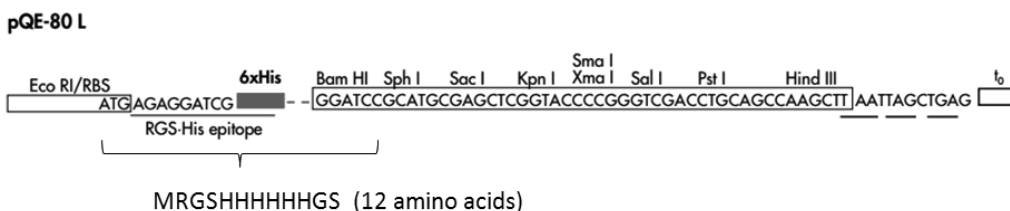


Figure 1 Twelve–amino–acid–residues from pQE–80L expression vector was added at the N–terminus of the recombinant coat protein

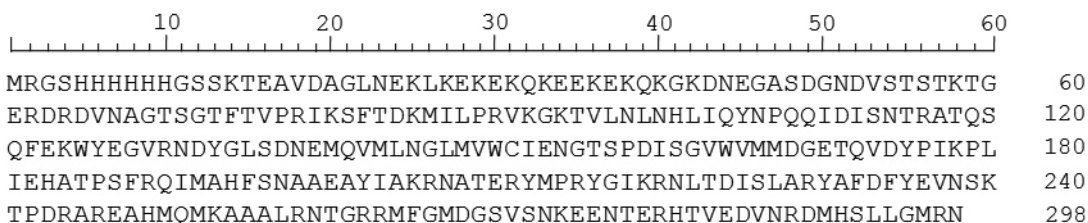


Figure 2 Amino acid sequence of the recombinant coat protein of ToLCNDV–[TH:KR:Cu:12]

2. การวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของ rCP ของเชื้อ ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12]

จากการวิเคราะห์สภาพทางกายภาพของโปรตีนด้วยโปรแกรม ProtParam พบว่า rCP มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{1362}H_{2141}N_{419}O_{380}S_{17}$ น้ำหนักโมเลกุล = 31,010.58 ดาลตัน (~31 kDa) และมีค่า pI = 10.17 เมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม ProtScale (Figure 3) พบว่า rCP มีความสามารถในการละลายน้ำได้ค่อนข้างดี โดยดูได้จาก amino acid position ที่มากกว่า 0 ซึ่งเป็นพวกที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) และพวกที่มีค่าต่ำกว่า 0 หรือมีค่าเป็นลบ (-) จะเป็นพวกที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) เมื่อ

พิจารณาจากสายโพลีเปปไทด์ทั้งเส้นแล้วสามารถประเมินได้ว่า rCP ของเชื้อ ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12] น่าจะมีการละลายน้ำค่อนข้างดี โดยพบว่ามีค่าเฉลี่ยของคุณสมบัติการละลายน้ำของโปรตีนเท่ากับ -0.642 เมื่อคำนวณด้วยโปรแกรม ProtParam พบว่าการวิเคราะห์สภาพทางกายภาพของโปรตีนในส่วนของ rCP ด้วยโปรแกรมทางชีวสารสนเทศมีส่วนช่วยในการประเมินลักษณะทางกายภาพเบื้องต้นของโปรตีนที่ศึกษาเมื่อชักนำให้มีการแสดงออกภายในเซลล์ *E. coli* และส่งผลต่อการเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการแยก rCP ให้บริสุทธิ์จากเซลล์ *E. coli*

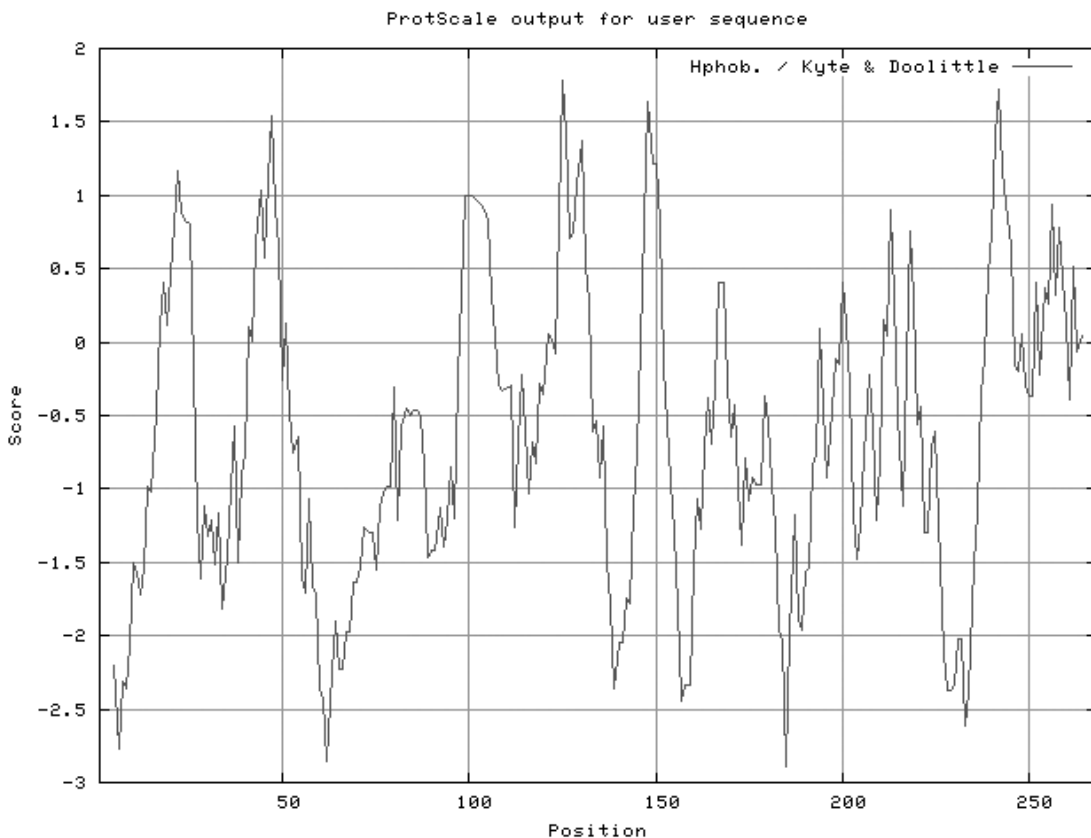


Figure 3 Analysis of hydropathicity from amino acid sequence of ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12] recombinant coat protein (rCP) by Kyte and Doolittle method (Kyte and Doolittle,1982)

3. การแสดงออกของยีนและการเตรียม rCP บริสุทธิ์

การชักนำการแสดงออกของ rCP gene ภายในเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α พบว่ามีการแสดงออกค่อนข้างต่ำ (low protein expression) โดยได้ผลผลิตโปรตีนที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อเซลล์แขวนลอยของ *E. coli* ปริมาตร 1 ลิตร และเมื่อนำไปสกัดให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column พบว่าบัฟเฟอร์ในระบบ native condition ไม่สามารถละลาย rCP ออกมาจาก bacterial lysate ได้ และไม่สอดคล้องกับการวิเคราะห์คุณสมบัติของการละลายน้ำซึ่งวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ProtScale และ ProtParam เนื่องจาก rCP มีการเกาะกลุ่มรวมตัวกับโมเลกุลไขมันที่อยู่ภายในเซลล์ *E. coli* กลายเป็นโมเลกุลเชิงซ้อนที่เรียกว่า inclusion body (Singh

et al., 2015) แต่เมื่อใช้บัฟเฟอร์ในระบบ denaturing condition คือ 8M urea buffer pH 8.0 จึงสามารถละลาย rCP ออกมาจาก inclusion body ได้ ดังนั้นผลผลิตโปรตีนจึงอยู่ในรูปที่เสียสภาพทางธรรมชาติ (denatured form) แต่ linear epitope ยังสามารถพบได้แม้ว่าโปรตีนเสียสภาพทางธรรมชาติแล้ว (Forsström *et al.*, 2015) ซึ่งเป็นอีพิโทปเป้าหมายที่จะใช้ในการกระตุ้นการตอบสนองของสัตว์ทดลอง โดยแอนติบอดีที่ผลิตได้จะยังคงความสามารถในการทำปฏิกิริยากับเชื้อ ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12] ในธรรมชาติ จากการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE (Figure 4) พบว่า rCP มีขนาดประมาณ 31 kDa ซึ่งมีขนาดของโปรตีนใกล้เคียงกับที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ProtParam

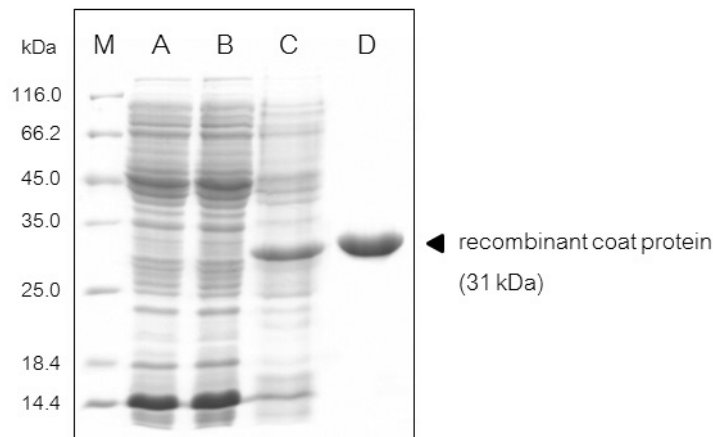


Figure 4 Analysis of protein expression by SDS-PAGE. Lane A-D are the bacterial extract from wild type *E. coli* DH5 α strain, IPTG-induced transformant in native condition, IPTG-induced transformant in denaturing condition and the purified rCP by Ni-NTA column chromatography compared to Pierce™ unstained protein MW markers Cat. no. 26610 (Thermo Scientific, USA) (M)

4. การตรวจวัดค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัม

แอนติซีรัมที่เก็บได้จำนวน 14 ครั้ง เมื่อให้ทำปฏิกิริยากับ rCP มีค่าไตเตอร์ 800, 3,200, 12,800, 25,600, 51,200, 51,200, 51,200, 51,200, 51,200, 102,400, 25,600, 25,600, 25,600 และ 25,600 โดยมีค่าไตเตอร์สูงสุดในสัปดาห์ที่ 15 หลังการฉีดกระตุ้น

สัตว์ทดลองครั้งแรกมีค่าเท่ากับ 102,400 และได้ทำแอนติซีรัมครั้งนี้มาใช้ในการทดลองต่อไป ซึ่งมีค่าไตเตอร์ใกล้เคียงกับที่รายงานการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียไวรัสสาเหตุโรคใบด่างของมะเขือเปราะที่เกิดจากเชื้อ *Eggplant yellow mosaic virus* (EYMV) ซึ่งมีรายงานการผลิต



แอนติบอดีต่อเบโกโมไวรัสในประเทศไทยเพียงไม่กี่ชนิด โดยในรายงานดังกล่าวใช้โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคลูกผสม เป็นแอนติเจนเช่นกัน (Saepaisal and Chowpongpan, 2015) และพบว่าแอนติซีรัมในครั้งที่ 5 มีค่าไตเตอร์สูงสุดเท่ากับ 204,800 เมื่อนำแอนติซีรัมที่เจือจาง 1:2000 ไปทดสอบกับ EYMV-rCP และพืชเป็นโรค (บด 1:10) ด้วยวิธี indirect ELISA ได้ค่า O.D. 405 nm เท่ากับ 3.213 และ 0.308 ตามลำดับ ในขณะที่แอนติซีรัมที่จำเพาะต่อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคลูกผสมของเชื้อ ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12] ที่ผลิตในงานวิจัยนี้ เจือจาง 1:000 ทำปฏิกิริยากับ ToLCNDV-rCP และพืชที่ติดเชื้อ (บด 1:10) ให้ค่า O.D. 405 nm เท่ากับ 1.955 และ 1.151 ตามลำดับ (Table 1) แสดงถึงประสิทธิภาพที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจสอบเชื้อ ToLCNDV ในพืชได้ดี

6. การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัม

แอนติซีรัมที่ผลิตจากการใช้ rCP ของเชื้อ ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12] เป็นแอนติเจนในการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง พบว่าสามารถทำปฏิกิริยาได้กับเชื้อ ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12] ในธรรมชาติ เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ TLCV ซึ่งมีมะเขือเทศเป็นพืชอาศัย และเชื้อ ACMV ซึ่งมีมันสำปะหลังเป็นพืชอาศัย แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อไวรัสวงศ์อื่นที่นำมาทดสอบ (Table 1) หากจะนำแอนติซีรัมนี้ไปใช้ตรวจเชื้อ ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12] หรือเชื้อ ToLCNDV สายพันธุ์อื่น ๆ ในพืชวงศ์แตง สามารถนำไปใช้ตรวจได้อย่างมีประสิทธิภาพ แม้ว่าแอนติซีรัมจะเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ TLCV และ ACMV แต่ยังไม่พบรายงานว่าเชื้อ

TLCV และ ACMV มีพืชอาศัยอยู่ในวงศ์แตง ดังนั้นยังสามารถนำแอนติซีรัมไปตรวจสอบเบื้องต้นสำหรับเชื้อ ToLCNDV ที่เข้าทำลายพืชวงศ์แตงได้ เนื่องจากพบว่าแอนติซีรัมที่ผลิตได้ทำปฏิกิริยากับเชื้อ ACMV ในมันสำปะหลัง ซึ่งไม่ได้เป็นพืชอาศัยของเชื้อ ToLCNDV และ TLCV เช่นเดียวกัน ดังนั้นน่าจะเป็นประโยชน์ในการตรวจสอบเชื้อ ACMV เบื้องต้นในมันสำปะหลังได้เช่นกัน แต่ไม่แนะนำให้ใช้แอนติซีรัมนี้กับการตรวจวินิจฉัยเชื้อ TLCV จากตัวอย่างมะเขือเทศ เนื่องจากเชื้อ ToLCNDV มีมะเขือเทศเป็นพืชอาศัยเหมือนกับเชื้อ TLCV ทั้งนี้เพื่อป้องกันความผิดพลาดในการตรวจวินิจฉัยจากรายงานการวิจัยในประเทศไทยที่มีการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีของ EYMV พบว่ามีความจำเพาะกับเชื้อ EYMV ในมะเขือเปราะโดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับพืชปกติที่นำมาทดสอบ (Saepaisal and Chowpongpan, 2015) และการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคลูกผสมของเชื้อ *Tomato yellow leaf curl Thailand virus* (TYLCTHV) เป็นแอนติเจน (Seepiban et al., 2017) พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากไฮบริโดมาโคลน D2 ทำปฏิกิริยาได้กับเชื้อเบโกโมไวรัสหลายชนิดนอกจาก TYLCTHV ดังนี้ *Tobacco leaf curl Yunnan virus* (TbLCYnV), *Pepper leaf curl virus* (PepLCV), *Agerratum yellow vein virus* (AYV), *Squash leaf curl China virus* (SLCCNV) และ *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) แต่ยังไม่ได้ทำการคัดเลือกกับเชื้อ ACMV ดังนั้นแอนติซีรัมต่อเชื้อ ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12] ในรายงานนี้จึงเป็นรายงานแรกที่สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามได้กับเชื้อ ACMV

Table 1 Investigation of the antiserum specificity with 26 plant viruses from seven families by indirect plate trapped antigen enzyme-linked immunosorbent assay (indirect PTA-ELISA)

Family	Virus species	Source	Cat. No.	O.D. 405 nm
<i>Bromoviridae</i>	CMV I	(Agdia, USA)	LPC 44700	0.189
	CMV II	(Agdia, USA)	LPC 44800	0.193
<i>Comoviridae</i>	CPMV	(Agdia, USA)	LPC 24200	0.188
	SqMV	(Agdia, USA)	LPC 26400	0.192
<i>Geminiviridae</i>	ACMV	(DSMZ, Germany)	PC 0421	0.891
	ICMV	(DSMZ, Germany)	PC 0875	0.224
	SLCMV	(DSMZ, Germany)	PC 0424	0.205
	SLCV	(DSMZ, Germany)	PC 0569	0.232
	TLCV	(DSMZ, Germany)	PC 1109	0.889
	TYLCV	(DSMZ, Germany)	PC 0588	0.214
	TYLCVTH	(DSMZ, Germany)	PC 0952	0.219
	Positive	rCP	–	1.955
Positive	Diseased sap	–	1.151	
<i>Potyviridae</i>	CABMV	Diseased sap	–	0.191
	PRSV	(Agdia, USA)	LPC 53500	0.189
	PVY	Purified virus	–	0.188
	WMV	(Agdia, USA)	LPC 54001	0.192
	ZYMV	(Agdia, USA)	LPC 77700	0.187
<i>Tombusviridae</i>	MNSV	(Agdia, USA)	LPC 12401	0.179
<i>Tymoviridae</i>	TSWV (Group I)	(Agdia, USA)	LPC 39300	0.180
	GRSV/TCSV (Group II)	(Agdia, USA)	LPC 61000	0.182
	INSV (Group III)	(Agdia, USA)	LPC 20500	0.190
	WSMoV/GBNV (Group IV)	(Agdia, USA)	LPC 61500	0.191
	CaCV (Group IV)	(DSMZ, Germany)	PC 0864	0.186
IYSV (Group V)	(Agdia, USA)	LPC 60500	0.175	
<i>Virgaviridae</i>	CGMMV	(Agdia, USA)	LPC 45701	0.184
	ORSV	Diseased sap	–	0.185
	TMV	Purified virus	–	0.181
Kind of Plant	Cassava	Healthy sap	–	0.182
	Chili	Healthy sap	–	0.181
	Cucumber	Healthy sap	–	0.186
	Papaya	Healthy sap	–	0.180
	Tobacco	Healthy sap	–	0.188

Note: The indirect PTA-ELISA was conducted in duplicate using the anti ToLCNDV-antiserum diluted 1:1,000. The cut-off value was twice of the absorbance value at 405 nm of negative control (healthy sap). Positive controls were ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12] rCP and diseased sap (Chantajorn and Hongprayoon, 2017).

7. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนของ CP gene ของเชื้อ ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12] กับเชื้อเบโกโมไวรัส 7 ชนิด ที่นำมาทดสอบความจำเพาะทางซีรัมวิทยา

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนในส่วนของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12] เปรียบเทียบกับเชื้อเบโกโมไวรัส 7 ชนิดที่นำมาทดสอบความจำเพาะกับแอนติซีรัม พบว่าความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนไม่สอดคล้องกับความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยา เนื่องจากแอนติซีรัมของเชื้อ ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12] เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อเบโกโมไวรัส 2 ชนิด คือ TLCV และ ACMV ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนที่ต่างกันมากกับเชื้อ ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12] คือ 76.95 และ 76.17 เปอร์เซ็นต์

ตามลำดับ แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อ ICMV และ SLCMV ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ (Table 2) และมีความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกันมากกว่าเชื้อ ACMV (Saunders *et al.*, 2002) เมื่อนำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของเชื้อเบโกโมไวรัสทั้ง 8 ชนิด มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อ ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12], ICMV และ SLCMV กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยเชื้อ TLCV และ TYLCVTH กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยเชื้อ TYLCV และ ACMV และกลุ่มที่ 4 คือ SLCV (Figure 5) โดยพบว่ากลุ่มที่ 2 3 และ 4 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกันแต่ถูกแยกกลุ่มออกมาเมื่อวิเคราะห์ด้วยความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

Table 2 Percentage of amino acid similarity of ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12] coat protein with those belonged to the other begomoviruses brought into examination

	ToLCNDV*	SLCMV	ICMV	TLCV	TYLCV	ACMV	TYLCVTH	SLCV
ToLCNDV*		90.62	90.23	76.95	76.95	76.17	75.39	74.00
SLCMV	90.62		97.66	77.73	78.12	76.95	76.17	72.80
ICMV	90.23	97.66		76.95	78.91	77.34	77.73	73.20
TLCV	76.95	77.73	76.95		72.27	71.48	87.89	69.60
TYLCV	76.17	78.12	78.91	72.27		82.95	72.66	72.11
ACMV	76.17	76.95	77.34	71.48	82.95		69.92	70.92
TYLCVTH	75.39	76.17	77.73	87.89	72.66	69.92		68.00
SLCV	74.00	72.80	73.20	69.60	72.11	70.92	68.00	

Note: ToLCNDV* = ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12]

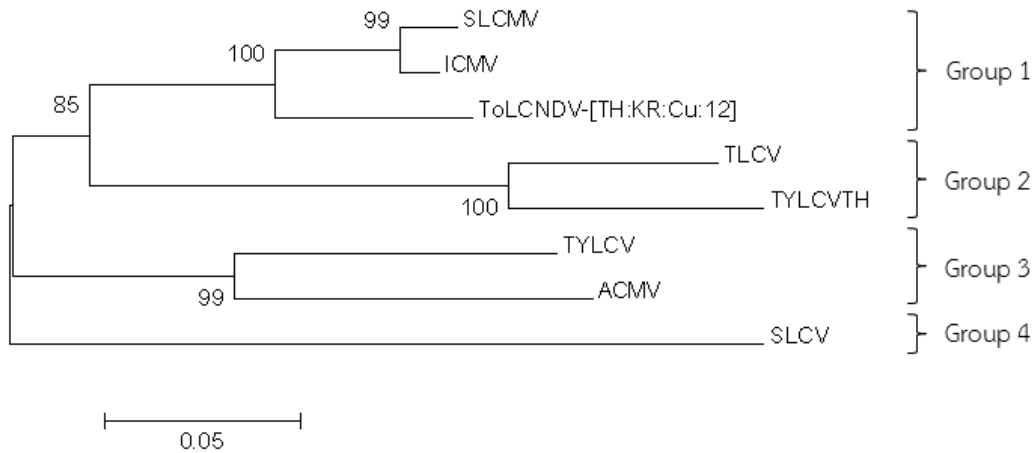


Figure 5 The phylogenetic tree showing the genetic relationship of ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12] to seven other begomoviruses in the specificity examination of anti-ToLCNDV antiserum

สรุป

การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ ToLCNDV ในงานวิจัยนี้ ใช้โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคลูกผสมของเชื้อไวรัส ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12] เป็นแอนติเจน โดยโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสเข้าสู่ pQE-80L expression vector และถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α เมื่อชักนำให้มีการผลิตโปรตีนลูกผสมพบว่าโปรตีนมีการแสดงออกได้น้อย (low expression) และต้องแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA resin ในสภาพ denaturing condition โปรตีนลูกผสมมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 31 kDa เมื่อนำไปฉีดกระต่ายเพื่อผลิตแอนติซีรัม พบว่าแอนติซีรัมมีค่าไตเตอร์สูงสุดเท่ากับ 102,400 ในสัปดาห์ที่ 10 ของการเก็บเลือด การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมกับเชื้อไวรัสจำนวน 26 ชนิด ใน 7 วงศ์ พบว่าสามารถทำปฏิกิริยากับเชื้อ ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12] ที่พบในธรรมชาติ แต่ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อไวรัสในสกุลอื่น 6 วงศ์ที่นำมาทดสอบ อย่างไรก็ตามแอนติซีรัมทำปฏิกิริยาข้ามกับ

เชื้อเบโกโมไวรัสอีก 2 ชนิด คือ TLCV และ ACMV ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนในส่วนของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเพียง 76.95 และ 76.17 เปอร์เซ็นต์ แต่กลับไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อไวรัส ICMV และ SLCMV ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนสูงถึง 90.23 และ 90.62 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัย และขอบคุณภาคีวิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน ในการอนุเคราะห์สถานที่ปลูกพืชทดลอง



เอกสารอ้างอิง

- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- Böttcher, B., S. Unseld, H. Ceulemans, R.B. Russell and H. Jeske. 2004. Geminata structures of *African cassava mosaic virus*. *J. Virol.* 78: 6758–6765.
- Chantajorn, S. and R. Hongprayoon. 2017. Complete DNA-A and DNA-B nucleotide sequences of Tomato leaf curl New Delhi virus-[Thailand:Kanchanaburi: Cucumber:2012] (ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12]) associated with curling leaf of cucumber in Kanchanaburi Province. *Agri. Sci. J.* 48(2): 231–244.
- Chiemsombat, P., K. Kittipakorn, S. Patarapuwadol, Y. Tantiwanit and S. Attathom. 1996. Cucurbit geminiviruses in Thailand, Abstract of the third Asia-Pacific conference on agricultural biotechnology: issues and choice. November 10th–15th, Thailand. p.15.
- Clark, M.F. and A.N. Adam. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475–483.
- Forsström, B., B.B. Axnäs, J. Rockberg, H. Danielsson, A. Bohlin and M. Uhlen. 2015. Dissecting antibodies with regards to linear and conformational epitopes. *PLoS ONE* 10(3): 1–11.
- Ito, T., P. Sharma, K. Kittipakorn and M. Ikegami. 2008. Complete nucleotide sequence of a new isolate of *Tomato leaf curl New Delhi virus* infecting cucumber, bottle gourd and muskmelon in Thailand. *Arch. Virol.* 153: 611–613.
- Kalendar, R. 2005. Fast PCR: PCR primer design, DNA and protein tools repeat and own database searches program. Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Finland. Available Source: <http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/programs/fastpcr>, July 15, 2015.
- Kositsakulchai, E., K. Reanwarakorn, S. Klinkong, R. Hongprayoon, W. Intanoo, A. Engkaninan and B. Wanking. 2013. Development of geographic information system of emerging and re-emerging diseases in cucurbits. *In*: Final report on the Development of detection and control systems for emerging and re-emerging diseases in cucurbits. National Research Council of Thailand, Bangkok. 292 p.
- Kyte, J. and R. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105–132.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–687.
- Saepaisal, S. and S. Chowpongpan. 2015. Production of polyclonal antiserum specific to coat protein gene of *Eggplant yellow mosaic virus* (EYMV). *Thai Agri. Res. J.* 33(3): 293–309.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The Neighbor-joining Method: A New method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4(4): 406–425.

- Sambrook, J. and D.W. Russel. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rded. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 213 p.
- Saunders, K., N. Salim, V.R. Mali, V.G. Malathi, R. Briddon, P.G. Markham and J. Stanley. 2002. Characterisation of *Sri Lankan cassava mosaic virus* and *indian cassava mosaic virus*: Evidence for Acquisition of a DNA B Component by a Monopartite *Begomovirus*. *Virology* 293: 63–74.
- Sawangjit, S. 2009. The complete nucleotide sequence of *Squash leaf curl China virus*– [Wax gourd] and its phylogenetic relationship to other geminiviruses. *Sci. Asia* 35: 131–136.
- Seepiban, C. 2002. Monoclonal antibody production and immunological assays for the detection of *Tomato yellow leaf curl virus* and geminivirus in Thailand. M.S. Thesis, Kasetsart University. (in Thai)
- Seepiban, C., S. Charoenvilaisiri, N. Warin, A. Bhunchoth, N. Phironrit, B. Phuangrat, O. Chatchawankanphanich, S. Attathom and O. Gajanandana. 2017. Development and application of triple antibody sandwich enzyme–linked immunosorbent assays for *begomovirus* detection using monoclonal antibodies against *Tomato yellow leaf curl Thailand virus*. *Viol. J.* 14:(99) 1–14.
- Singh, A., V. Upadhyay, A.K. Upadhyay, S.M. Singh and A.K. Panda. 2015. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microb. Cell Fact.* 14: 41–50.