การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Tomato leaf curl New Delhi virus* โดยใช้เพปไทด์สังเคราะห์เป็นแอนติเจน

Production of Polyclonal Antibody Against *Tomato Leaf Curl New Delhi Virus* Exploiting Synthesized Peptide as An Antigen

กานต์ชนก โพธิ์ชะคุ้ม[1,2] และรัชนี ฮงประยูร[1,2,3*]
Kanchanok Phochakum[1,2] and Ratchanee Hongprayoon[1,2,3*]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) ซึ่งเป็นเชื้อในกลุ่มเบโกโมไวรัสที่เข้าทำลายพืชวงศ์แตงในประเทศไทย โดยใช้เพปไทด์สังเคราะห์เป็นแอนติเจน ซึ่งพิจารณาจากบริเวณที่เป็น epitope บนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคโดยอ้างอิงจากลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้างของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ *African cassava mosaic virus* (ACMV) และเชื้อ ToLCNDV ที่พบในประเทศไทย เพปไทด์สังเคราะห์มีขนาด 20 เรสิดิวส์ คือ NIKTKNHTRRPTGTPQDFGE โดยนำไปพ่วงกับ bovine serum albumin (BSA) และฉีดกระตุ้นกระต่ายพันธุ์ New Zealand White ตามโปรแกรมดังนี้ ฉีดกระตุ้นด้วย peptide-BSA conjugate ในสัปดาห์ที่ 1 และ 5 โดยฉีดเข้าทางใต้ผิวหนังบริเวณคอของกระต่าย (subcutaneous injection) และเข้ากล้ามเนื้อบริเวณขาหลัง (intramuscular injection) ตามลำดับ เริ่มเก็บเลือดจากใบหูในสัปดาห์ที่ 6-15 โดยเก็บสัปดาห์ละ 1 ครั้ง พบว่าแอนติซีรัมมีค่าไตเตอร์อยู่ระหว่าง 25,600-51,200 โดยแอนติซีรัมในสัปดาห์ที่ 9 มีค่าไตเตอร์สูงสุดคือ 51,200 ในขณะที่แอนติซีรัมในสัปดาห์ที่ 6-8 และ 10-15 มีค่าไตเตอร์เท่ากับ 25,600 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตได้ อัตราส่วน 1:200 ในการทำปฏิกิริยากับเชื้อ ToLCNDV ด้วยเทคนิค indirect plate-trapped antigen enzyme-linked immunosorbent assay (indirect PTA-ELISA) พบว่ามีความไวในการทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นพืชเป็นโรคได้ถึงค่าการเจือจางที่ 1:320 งานวิจัยนี้เป็นรายงานแรกที่สามารถผลิตแอนติบอดีซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อ ToLCNDV เพียงชนิดเดียว โดยไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อไวรัสอื่นที่นำมาทดสอบจำนวน 21 ชนิด

คำสำคัญ: พืชวงศ์แตง เบโกโมไวรัส การตรวจสอบไวรัส การสังเคราะห์เพปไทด์ แอนติบอดี

Abstract

The main objective of this research was to produce an antibody specific to *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV), which is one of begomoviruses infecting cucurbits in Thailand. A peptide sequence, derived from the target epitope on the viral capsid protein based on *African cassava mosaic virus* (ACMV) and ToLCNDV (reported in Thailand) coat protein amino acid sequences and structures, was used as an antigen. The synthesized peptide contained 20 amino acid residues that were as follows: NIKTKNHTRRPTGTPQDFGE. It was then conjugated with bovine serum albumin (BSA) and used to immunize New Zealand White rabbits in the 1st and 5th weeks by subcutaneous and intramuscular injection, respectively. The antisera were collected weekly from the rabbits, over the period of the 6th-15th weeks. Titers of the antisera ranged from 25,600-51,200, of which the highest titer obtained was from the 9th week (51,200). The titers at the 6th-8th and 10th-15th weeks were both 25,600. Determination of the antiserum sensitivity and specificity were performed using an indirect plate-trapped antigen enzyme-linked immunosorbent assay (indirect PTA-ELISA) with the antiserum at 1:200 dilution. The results showed sensitivity up to 1:320 dilution of plant sap. This is the first report of the production of an antiserum that is specific to ToLCNDV only, and which does not cross react with the other 21 plant viruses brought into examination.

Keywords: cucurbit, begomovirus, virus detection, peptide synthesis, antibody

[1] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม 73140
[2] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900
[3] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม 73140
[1] Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140
[2] Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900
[3] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140
*Corresponding author, Email: agrrat@ku.ac.th

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

พืชวงศ์แตง เช่น แตงกวา แตงโม เมลอน ฯลฯ จัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีมูลค่าทางการตลาดสูง ซึ่งพืชในวงศ์นี้นอกจากจะใช้สำหรับบริโภคผลสดแล้ว ยังมีการใช้เป็นวัตถุดิบในภาคอุตสาหกรรม เช่น อาหารกระป๋องต่าง ๆ รวมถึงอุตสาหกรรมการผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อส่งออกซึ่งมีมูลค่าสูงอยู่ในอันดับต้น ๆ ของประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2561 พบว่ามีปริมาณการส่งออกเมล็ดพันธุ์แตงโม แตงกวา และฟักทอง เป็นอันดับ 4, 8 และ 10 ตามลำดับ โดยมีมูลค่ารวมทั้งสิ้นประมาณ 1,300 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2561) ปัญหาที่สำคัญของการผลิตพืชในกลุ่มนี้ได้แก่ โรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัส ซึ่งเชื้อไวรัสในจีนัส *Begomovirus* วงศ์ *Geminiviridae* จัดเป็นเชื้อไวรัสที่สร้างความเสียหายต่อพืชวงศ์แตงได้อย่างกว้างขวาง (Vincent, 2013) เชื้อในกลุ่มเบโกโมไวรัสนี้มีสารพันธุกรรมเป็นชนิด single-stranded closed circular DNA มีจีโนมแบบ monopartite และ bipartite อนุภาคมีลักษณะเป็นทรงกลมคู่ เส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคประมาณ 15-22 นาโนเมตร ไม่มี envelope ยาวประมาณ 38 นาโนเมตร (Lacatus and Sunter, 2008) ถ่ายทอดเชื้อได้โดยมีแมลงหวี่ขาวเป็นพาหะ (*Bemisia tabaci*) (Moriones et al., 2017) พืชที่ติดเชื้อไวรัสจะแสดงอาการใบด่างเหลือง ใบหงิก ลดรูป และต้นแคระแกร็น (Brown et al., 2002) ในประเทศไทยพบรายงานการเข้าทำลายของเชื้อในกลุ่มเบโกโมไวรัสในพืชวงศ์แตง ได้แก่ *Squash leaf curl China virus* (SLCCNV) (Ito et al., 2008) *Squash leaf curl Yunnan virus* (SLCuYV) (รุ่งทิพย์ จั่นเพ็ชร และคณะ, 2559; ณัฐพร บุตรนุช และคณะ, 2562) และ *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) (Chiemsombat et al., 1996; Ito et al,. 2008; สรรชัย จันทะจร และรัชนี ฮงประยูร, 2560) โดยเชื้อ ToLCNDV มีรายงานการพบครั้งแรกที่ประเทศอินเดียในปี 1995 (Chakraborty, 2008) เป็นไวรัสที่มีความสำคัญเนื่องจากสามารถเข้าทำลายพืชได้ทั้งในวงศ์แตงและมะเขือเทศ นอกจากนั้นยังเป็นเชื้อที่อยู่ในกลุ่มเชื้อเฝ้าระวังของ European and Mediterranean Plant Protection Organization ซึ่งมีสมาชิกรวม 52 ประเทศในแถบยุโรป (European and Mediterranean Plant Protection Organization, 2019) สำหรับประเทศไทยมีรายงานการเข้าทำลายพืชหลายชนิด เช่น ฟักทอง น้ำเต้า (Chiemsombat et al., 1996) บวบเหลี่ยม (Seepiban et al., 2017) และแตงกวา (สรรชัย จันทะจร และรัชนี ฮงประยูร, 2560) การตรวจสอบพืชที่ติดเชื้อไวรัสซึ่งนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ การตรวจสอบด้วยวิธีการทางเซรุ่มวิทยา เช่น เทคนิค indirect plate-trapped antigen enzyme-linked immunosorbent assay (indirect PTA-ELISA) โดยใช้แอนติบอดีและการตรวจสอบด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส อย่างไรก็ตามการตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect PTA-ELISA มีข้อดีตรงที่สามารถตรวจสอบตัวอย่างพืชได้คราวละมาก ๆ ทำให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย ในปัจจุบันแหล่งจำหน่ายแอนติบอดีต่อเชื้อเบโกโมไวรัสในประเทศไทยมีเพียง 2 แหล่ง ได้แก่ ศูนย์ชีววัสดุประเทศไทย สำนักงานพัฒนาและเทคโนโลยีแห่งชาติ กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ซึ่งมี anti-begomovirus TBRC1-11 และ TBRC1-13 monoclonal antibody (MAb) และ คลินิกสุขภาพพืช ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งมี anti-ToLCNDV polyclonal antibody (PAb) อย่างไรก็ตามแอนติบอดีจากทั้งสองแหล่งมีรายงานการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อไวรัสชนิดอื่นในกลุ่มเบโกโมไวรัส โดย anti-begomovirus TBRC1-11 PAb และ TBRC1-13 MAb ทำปฏิกิริยาต่อเชื้อ *Tomato yellow leaf curl Thailand virus* (TYLCTHV) และเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ ToLCNDV (Thailand Bioresource Research Center, 2020) ส่วน anti-ToLCNDV PAb ทำปฏิกิริยากับเชื้อ ToLCNDV และเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ *African cassava mosaic virus* (ACMV) (สรรชัย จันทะจร และรัชนี ฮงประยูร, 2560) แม้แต่แอนติบอดีที่มีจำหน่ายจากต่างประเทศก็เกิดปฏิกิริยาข้ามต่อเชื้อ *Squash leaf curl virus* (SLCuV) และ *Bean golden mosaic virus* (BGMV) (Agdia, 2020) ดังนั้นจึงยังไม่มีแอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อ ToLCNDV เพียงชนิดเดียว งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส ToLCNDV โดยใช้วิธีการสังเคราะห์เพปไทด์ที่ออกแบบโดยการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ ACMV ซึ่งมีรายละเอียดของโครงสร้างอนุภาคมากที่สุดสำหรับไวรัสในกลุ่มนี้ (Böttcher et al., 2004) เพื่อนำมาใช้ในการผลิตแอนติเจน และพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ ToLCNDV ซึ่งความสำเร็จของงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการวินิจฉัยโรค การเฝ้าระวัง รวมทั้งการคัดเลือกพืชที่ต้านทานต่อเชื้อในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานโรคต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการศึกษา

การวิเคราะห์และออกแบบเพปไทด์เพื่อใช้เป็นแอนติเจน

เนื่องจากปัจจุบันยังไม่มีรายงานโครงสร้างของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ ToLCNDV จึงจำเป็นต้องใช้การอ้างอิงและเปรียบเทียบกับเชื้อ ACMV ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสในกลุ่มเดียวกันและมีลำดับกรดอะมิโนในส่วนของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเหมือนกับเชื้อ ToLCNDV มากถึง 84.9% สำหรับคัดเลือก epitope ส่วนที่อยู่ด้านผิวนอกของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส ในการศึกษานี้ใช้ลำดับกรดอะมิโนบริเวณโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ ToLCNDV ที่พบในประเทศไทยซึ่งมีรายงานในฐานข้อมูลของ GenBank จำนวนทั้งสิ้น 6 ตัวอย่าง ได้แก่ accession number: AB330079.1, AB368447.1, KU992383.1, JN809814.1, AF102276.1 และ AB368448.1 นำมาวิเคราะห์บริเวณ linear epitope ของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค โดยใช้โปรแกรม IEDB Analysis Resource (http://tools.iedb.org/bcell/) เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ ACMV (Böttcher et al., 2004) จากนั้นสั่งสังเคราะห์เพปไทด์จากบริษัท Integrated Technology ประเทศสหรัฐอเมริกา

การพ่วงเพปไทด์สังเคราะห์กับโปรตีนแคริเออร์โดยวิธี Glutaraldehyde-Mediated Hapten-Carrier Conjugation

พ่วงเพปไทด์สังเคราะห์กับโปรตีนแคริเออร์ตามวิธี Glutaraldehyde-Mediated Hapten-Carrier Conjugation (Hermanson, 1996) โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) หรือ ovalbumin (OVA) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ละลายใน 0.1 M $NaCO_3$ ที่ผสม 0.15 M NaCl, pH 8.5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมเพปไทด์สังเคราะห์ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและเติม glutaraldehyde ให้มีความเข้มข้น 1% จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 4 ºC เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ไปไดอะไลซิส (dialysis) ใน phosphate buffered saline (137 mM NaCl, 2.7 mM KCL, 10 mM Na_2HPO_4 และ 1.8 mM KH_2PO_4) วิเคราะห์ผลการพ่วงเพปไทด์ดังกล่าวด้วยเทคนิค sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) โดยใช้ 12% separating gel และ 6% stacking gel

การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ peptide-BSA conjugate

ใช้กระต่ายทดลองสายพันธุ์ New Zealand White อายุประมาณ 3 เดือน จำนวน 1 ตัว โดยมีโปรแกรมการฉีดกระตุ้นกระต่ายทดลองดังนี้ สัปดาห์ที่ 1 ฉีด peptide-BSA conjugate ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผสมกับ Freund's complete adjuvant อัตราส่วน 1:1 (v/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เข้าทางใต้ผิวหนังบริเวณคอของกระต่าย (subcutaneous injection) ต่อมาในสัปดาห์ที่ 5 ฉีดแอนติเจนที่ผสมกับ Freund's incomplete adjuvant อัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เข้ากล้ามเนื้อบริเวณขาหลัง (intramuscular injection) เริ่มเก็บเลือดจากใบหูในสัปดาห์ที่ 6 หลังจากการฉีดกระตุ้นครั้งแรก โดยเก็บสัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 10 สัปดาห์ (ผ่านการพิจารณาและได้ปฏิบัติตามกฎระเบียบตามที่คณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ของสถาบันกำหนด โดยมีเลขที่ใบรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ดังนี้ ACKU 60-AGK-045)

การตรวจสอบค่าไตเตอร์ของโพลีโคลนอลแอนติบอดี

ตรวจสอบค่าไตเตอร์ของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ต่อ peptide-BSA conjugate ด้วยวิธี indirect PTA-ELISA ดัดแปลงจากวิธีการของ ธีรวศิษฐ์ แพทย์สมาน และคณะ (2560) โดยเคลือบหลุม ELISA plate ด้วย peptide-OVA conjugate ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่ละลายใน coating buffer (ประกอบด้วย $NaHCO_3$ 2.93 กรัม และ Na_2CO_3 1.59 กรัม, pH 9.6) ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 ºC ข้ามคืน ล้าง ELISA plate ด้วย PBST buffer (ประกอบด้วย NaCl 8 กรัม, Na_2HPO_4 $12H_2O$ 2.9 กรัม, KH_2PO_4 0.2 กรัม, KCl 0.2 กรัม และ Tween 20 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติม blocking buffer (5% skim milk ที่ละลายใน PBS) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้าง ELISA plate ด้วย PBST buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติมแอนติซีรัมที่เจือจางใน blocking buffer แบบ 2-fold serial dilutions เริ่มจาก 1:400 ถึง 1:204,800 ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้าง ELISA plate ด้วย PBST buffer 3 ครั้งเช่นเดิม จากนั้นเติม Goat anti-Rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase (GAR-AP) ที่เจือจางใน blocking buffer อัตราส่วน 1:30,000 ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง ELISA plate ด้วย PBST buffer 3 ครั้งเช่นเดิม ตรวจสอบผลของปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายสับสเตรท *p*-Nitrophenyl phosphate (PNPP) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใน substrate buffer (ประกอบด้วย diethanolamine 97 มิลลิลิตร, sodium azide 0.2 กรัม และ $MgCl_2$ 0.1 กรัม, pH 9.8) ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 90 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA reader (TECAN, Switzerland) โดย negative control ที่ใช้คือ PBS ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจสอบความจำเพาะ (specificity) ของโพลีโคลนอลแอนติบอดี

ตรวจสอบความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ด้วยวิธี indirect PTA-ELISA ตามวิธีการดังกล่าวข้างต้น โดยใช้แอนติซีรัมจากสัปดาห์ที่ 9 เจือจางใน blocking buffer อัตราส่วน 1:200 ทดสอบกับตัวอย่างเชื้อไวรัสพืช 5 จีนัส จำนวน 21 ชนิด ซึ่งซื้อมาจากบริษัท DSMZ ประเทศ Germany ได้แก่ จีนัส *Begomovirus* จำนวน 8 ชนิด คือ *African cassava mosaic virus* (ACMV), *Bean golden mosaic virus* (BGMV), *Squash leaf curl virus* (SLCuV), Sri Lankan cassava mosaic virus (SLCMV), *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV), *Tomato yellow leaf curl Thailand virus* (TYLCTHV), *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV); จีนัส *Potyvirus* จำนวน 7 ชนิด คือ *Chilli veinal mottle virus* (ChiVMV), *Pepper mottle virus* (PepMoV), *Papaya ringspot virus* (PRSV), *Pepper veinal mottle virus* (PVMV), *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV); จีนัส *Tobamovirus* จำนวน 3 ชนิด คือ *Bell pepper mottle virus* (BPeMV), *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), *Pepper mild mottle virus* (PMMoV); จีนัส *Tospovirus* จำนวน 2 ชนิด คือ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV), *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) และจีนัส *Cucumovirus* จำนวน 1 ชนิด คือ *Cucumber mosaic virus* (CMV) เปรียบเทียบกับ negative control ที่ใช้คือน้ำคั้นใบฟักทองปกติทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี

การตรวจสอบความไว (sensitivity) ของโพลีโคลนอลแอนติบอดี

ตรวจสอบความไวของโพลีโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect PTA-ELISA โดยบดตัวอย่างใบพืชที่ติดเชื้อ ToLCNDV ใน coating buffer อัตราส่วน 1:10 จากนั้นเจือจางน้ำคั้นพืชแบบ 2-fold serial dilutions ให้มีค่าการเจือจาง 1:10 - 1:10,240 ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วยการเติม GAR-AP และสารละลายสับสเตรท *p*-Nitrophenyl phosphate ตามวิธีการดังกล่าวข้างต้น

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การวิเคราะห์และออกแบบเพปไทด์เพื่อใช้เป็นแอนติเจน

เมื่อวิเคราะห์ linear epitope ของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ ToLCNDV โดยเปรียบเทียบกับรายงานโครงสร้างโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ ACMV และคัดเลือกส่วนของลำดับกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็น epitope ที่อยู่ด้านผิวนอกของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (Figure 1) ได้ลำดับกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 124-132 และ 143-154 ซึ่งวิเคราะห์ว่าเป็น linear epitope การใช้ epitope ชนิดนี้เนื่องจากมีข้อดีคือ จะยังคงรูปร่างเดิมเสมอแม้ว่าโปรตีนจะมีการเสื่อมสภาพ (denatured protein) ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้ในระหว่างกระบวนการผลิตแอนติเจน และเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ ACMV กรดอะมิโนลำดับที่ N130, Q131 และ Q154 เป็นลำดับกรดอะมิโนที่มีรายงานอย่างแน่ชัดว่าเป็นส่วนที่อยู่ด้านผิวนอกของอนุภาคไวรัส (Böttcher et al., 2004) จึงเลือกบริเวณที่ใกล้เคียงกับกรดอะมิโนนั้นเป็นหลัก ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนดังนี้ NIKTKNHTRRPTGTPQDFGE เพื่อส่งสังเคราะห์ต่อไป

```
                    124       132             143         154
ACMV          IWLDETIKKQNHTNNVIFYLLRDRRPYGNAPQDFGQIFNMFDNEPSTATIKNDLRDRFQV      180
AF102276.1    IWMDENIKTKNHTNSVMFFLVRDRRPTG-TPQDFGEVFNMFDNEPSTATVKNMHRDRYQV      178
KU992383.1    IWMDENIKTKNHTNSVMFFLVRDRRPTG-TPQDFGEVFNMFDNEPSTATVKNMHRDRYQV      178
AB330079.1    IWMDENIKTKNHTNSVMFFLVRDRRPTG-TPQDFGEVFNMFDNEPSTATVKNMHRDRYQV      178
JN809814.1    IWMDENIKTKNHTNSVMFFLVRDRRPTG-TPQDFGEVFNMFDNEPSTATVKNMHRDRYQV      178
AB368448.1    IWMDENIKTKNHTNSVMFFLVRDRRPTG-TPQDFGEVFNMFDNEPSTATVKNMHRDRYQV      178
AB368447.1    IWMDENIKTKNHTNSVMFFLVRDRRPTG-TPQDFGEVFNMFDNEPSTATVKNMHRDRYQV      178
```

Figure 1 Partial coat protein gene alignment of ACMV and ToLCNDV by Clustal W. Highlighted sequences are the predicted linear epitopes analyzed by IEDB Analysis Resource Program.

การพ่วงเพปไทด์สังเคราะห์กับโปรตีนแคริเออร์โดยวิธี Glutaraldehyde-Mediated Hapten-Carrier Conjugation

การพ่วงเพปไทด์กับ BSA และ OVA และตรวจสอบผลการพ่วงด้วยเทคนิค 12% SDS-PAGE พบว่า ขนาดของ peptide conjugate มีขนาดใหญ่กว่า BSA และ OVA แสดงว่าประสบความสำเร็จในการพ่วง (Hermanson, 1996) (Figure 2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

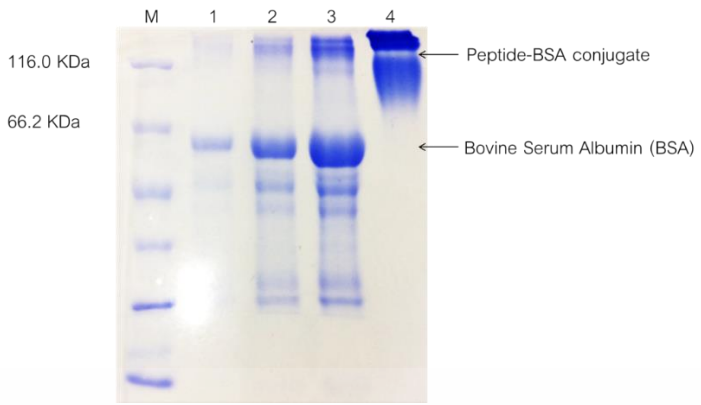

Figure 2 Evaluation of the ToLCNDV peptide-BSA conjugation by SDS-PAGE in 12% separating gel [M = Unstained Protein MW Marker (Thermo Scientific, USA), 1 = BSA 0.5 mg/ml, 2 = BSA 1 mg/ml, 3 = BSA 2 mg/ml and 4 = peptide-BSA conjugate.]

การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ peptide-BSA conjugate การตรวจหาค่าไตเตอร์ และการตรวจสอบความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดี

จากการเก็บเลือดกระต่ายทดลองพันธุ์ New Zealand White สัปดาห์ที่ 6-15 จำนวนทั้งสิ้น 10 ครั้ง พบว่า แอนติซีรัมมีค่าไตเตอร์ตั้งแต่ 25,600-51,200 โดยมีค่าสูงสุดในสัปดาห์ที่ 9 (51,200) รองลงมาได้แก่สัปดาห์ที่ 6-8 และ 10-15 (25,600) (Figure 3) การตรวจสอบความไวของแอนติบอดีที่ผลิตได้ในการตรวจสอบเชื้อด้วยแอนติบอดีในสัปดาห์ที่ 9 ที่เจือจาง 1:200 พบว่า สามารถตรวจเชื้อไวรัสในน้ำคั้นพืชได้ถึงระดับการเจือจาง 1:320 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการวิจัยของ สรรชัย จันทะจร และรัชนี ฮงประยูร (2560) ที่ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส ToLCNDV โดยใช้โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคลูกผสมเป็นแอนติเจน พบว่ามีความสามารถในการตรวจสอบเชื้อ ToLCNDV ได้ใกล้เคียงกันโดยวิธี indirect PTA-ELISA แต่จากการตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดี พบว่า แอนติบอดีที่ผลิตได้โดยการใช้เพปไทด์สังเคราะห์ในงานวิจัยนี้มีความจำเพาะกับเชื้อ ToLCNDV สูง โดยไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับเชื้ออื่นที่นำมาทดสอบโดยรวมถึงเชื้อไวรัสที่มีรายงานว่าเกิดปฏิกิริยาข้ามกับแอนติบอดีที่มีจำหน่ายในปัจจุบัน (สรรชัย จันทะจร และรัชนี ฮงประยูร, 2560; Agdia, 2020; Thailand Bioresource Research Center, 2020) ดังนั้นแอนติบอดีที่ผลิตได้ในการศึกษานี้จึงเป็นรายงานแรกที่สามารถผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ ToLCNDV เพียงชนิดเดียว ทั้งนี้เนื่องจากบริเวณที่เลือกมาใช้เป็นแอนติเจนมีการคัดเลือกจาก epitope เพียง 2 ตำแหน่ง มีขนาดรวม 2.2 กิโลดาลตัน ซึ่งแตกต่างจากวิธีการผลิตแอนติเจนจากโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคลูกผสมในรายงานของ สรรชัย จันทะจร และรัชนี ฮงประยูร (2560) ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่า คือขนาด 31 กิโลดาลตัน ทำให้มีโอกาสที่จะพบ epitope ได้มากกว่าและอาจทำปฏิกิริยาข้ามกับไวรัสชนิดอื่นที่มี common epitope ได้ โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากงานวิจัยนี้เป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับใช้ในงานการตรวจสอบพืชที่ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้

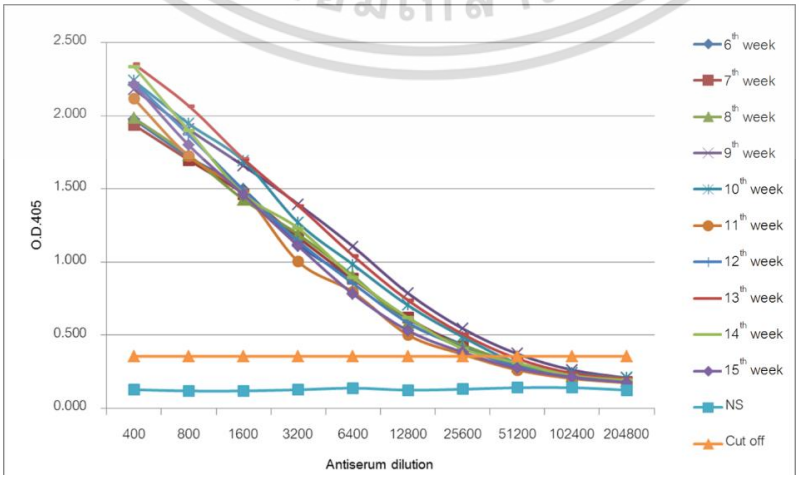

Figure 3 Titration of anti-ToLCNDV polyclonal antiserum reacting with peptide-OVA conjugate. Antisera were collected from 6th-15th weeks after the first immunization and analyzed by indirect PTA-ELISA.

ไม่ว่าการใช้ | ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 1 Specificity testing of the anti-ToLCNDV antiserum against positive control samples of 21 plant virus species in 8 genera by indirect PTA-ELISA. All virus antigens were purchased from DSMZ, Germany.

Genus	Antigen	$O.D._{405}$ [/1]	Result
Begomovirus	*African cassava mosaic virus* (ACMV)	0.233	-
	Bean golden mosaic virus (BGMV)	0.206	-
	Squash leaf curl virus (SLCuV)	0.219	-
	Sri Lankan cassava mosaic virus (SLCMV)	0.220	-
	Tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV)	**1.193**	**+**
	Tomato yellow leaf curl Thailand virus (TYLCTHV)	0.196	-
	Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)	0.208	-
	Watermelon chlorotic stunt virus (WmCSV)	0.173	-
Potyvirus	*Chilli veinal mottle virus* (ChiVMV)	0.146	-
	Pepper mottle virus (PepMoV)	0.231	-
	Papaya ringspot virus	0.174	-
	Pepper veinal mottle virus (PVMV)	0.188	-
	Pepper yellow mosaic virus (PepYMV)	0.205	-
	Watermelon mosaic virus (WMV)	0.132	-
	Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)	0.177	-
Tobamovirus	*Bell pepper mottle virus* (BPeMV)	0.188	-
	Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)	0.213	-
	Pepper mild mottle virus (PMMoV)	0.222	-
Tospovirus	*Capsicum chlorosis virus* (CaCV)	0.178	-
	Watermelon silver mottle virus (WSMoV)	0.219	-
Cucumovirus	*Cucumber mosaic virus* (CMV)	0.170	-
Negative control	Healthy plant sap/pumpkin	0.139	-

[/1] The absorbance value was the mean value obtained from two independent assays at 90 min after adding the substrate at 37°C and the cut-off value was twice of the negative control.

สรุปผลการศึกษา

งานวิจัยนี้ได้ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ ToLCNDV ที่เข้าทำลายพืชวงศ์แตงในประเทศไทย โดยใช้เพปไทด์สังเคราะห์ที่วิเคราะห์จากลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ ToLCNDV ที่พบในประเทศไทย และเลือกจากบริเวณผิวด้านนอกของอนุภาคซึ่งมีลักษณะเป็น linear epitope นำไปพ่วงกับโปรตีนแคริเออร์ BSA เพื่อใช้เป็นแอนติเจน พบว่าแอนติซีรัมที่เก็บได้ทั้งสิ้นจำนวน 10 สัปดาห์ มีค่าไตเตอร์อยู่ในช่วงระหว่าง 25,600-51,200 โดยแอนติซีรัมที่เก็บได้ในสัปดาห์ที่ 9 หลังจากการฉีดกระตุ้นครั้งแรก มีค่าไตเตอร์สูงสุด คือ 51,200 และเมื่อนำแอนติซีรัมเจือจางในอัตราส่วน 1:200 มาทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจสอบเชื้อไวรัสในน้ำคั้นพืชเป็นโรค พบว่า มีความไวในการตรวจสอบน้ำคั้นพืชเป็นโรคที่ระดับการเจือจาง 1:320 โดยวิธี indirect PTA-ELISA และแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะต่อเชื้อ ToLCNDV เพียงชนิดเดียวเท่านั้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม และได้รับการสนับสนุนการวิจัยภายใต้แผนงานเสริมสร้างศักยภาพและพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ ตามทิศทางยุทธศาสตร์การวิจัยและนวัตกรรม ประเภทบัณฑิตศึกษา จากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2562

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ณัฐพร บุตรนุช, วิชัย โฆสิตรัตน และสุจินต์ ภัทรภูวดล. 2562. การประเมินความต้านทานของพืชวงศ์แตงบางชนิดต่อเชื้อ *Squash leaf curl Yunnan virus*. *วารสารวิชาการเกษตร* 37(1): 14-26.

ธีร์วศิษฐ์ แพทย์สมาน, รัชนี ฮงประยูร และสิริกุล วะสี. 2560. โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสใบด่างพริก: การผลิต คุณสมบัติ และการนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัย. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร* 48(3): 403-414.

รุ่งทิพย์ จั่นเพ็ชร, วิชัย โฆสิตรัตน, Scott Adkins และสุจินต์ ภัทรภูวดล. 2559. การพัฒนาเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เพื่อการตรวจสอบเชื้อ *Squash leaf curl Yunnan virus* ของพืชวงศ์แตงในประเทศไทย. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร* 48(2): 221-230.

สรรชัย จันทะจร และรัชนี ฮงประยูร. 2560. การผลิตโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคลูกผสมเพื่อการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *Tomato leaf curl New Delhi virus* – [Thailand: Kanchanaburi: Cucumber: 2012]. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร* 48(3): 415-429.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2561. ปริมาณและมูลค่าการส่งออกเมล็ดพันธุ์. กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. http://www.oae.go.th/view/1/ปัจจัยการผลิต/TH-TH (20 พฤษภาคม 2562).

Agdia. 2020. ELISA reagent set for *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) - cucurbit. Agdia incorporated. https://orders.agdia.com/agdia-set-tolcndv-cuc-alkphos-sra-38900 (7 January 2020).

Böttcher, B., Unseld, S., Ceulemans, H., Russell, R. B., and Jeske, H. 2004. Geminate structures of *African cassava mosaic virus*. *Journal of Virology* 78(13): 6758-6765.

Brown, J. K., Idris, A. M., Alteri, C., and Stenger, D. C. 2002. Emergence of a new cucurbit-infecting Begomovirus species capable of forming viable reassortants with related viruses in the *Squash leaf curl virus* cluster. *Phytopathology* 92(7): 734-742.

Chiemsombat, P., Kittipakorn, K., Patarapuwadol, S., Tantiwanit, Y., and Attathom, S. 1996. Cucurbit geminiviruses in Thailand. In *The Third Asia–Pacific Conference on Agricultural Biotechnology*. pp.15. Melia Hua Hin Hotel, Prachuap Khiri Khan.

Chakraborty, S. 2008. *Tomato leaf curl viruses* from India (*Geminiviridae*). In *Encyclopedia of Virology*. B. W. J., Mahy, and M. H. V., van Regenmortel, eds. pp. 124-133. London: Elsevier.

European and Mediterranean Plant Protection Organization. 2019. Current EPPO member countries. European and Mediterranean Plant Protection Organization. https://www.eppo.int/ABOUT_EPPO/eppo_members (28 October 2019).

Hermanson, G. T. 1996. *Bioconjugate techniques*. California: Academic Press.

Ito, T., Sharma, P., Kittipakorn, K., and Ikegami, M. 2008. Complete nucleotide sequence of a new isolate of *Tomato leaf curl New Delhi virus* infecting cucumber, bottle gourd and muskmelon in Thailand. *Archives of Virology* 153(3): 611-613.

Lacatus, G., and Sunter, G. 2008. Functional analysis of bipartite begomovirus coat protein promoter sequences. *Journal of Virology* 376(1): 79-89.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 277(5259): 680-685.

Moriones, E., Praveen, S., and Chakraborty, S. 2017. *Tomato leaf curl New Delhi virus*: an emerging virus complex threatening vegetable and fiber crops. *Viruses* 9(10): 1-18.

Thailand Bioresource Research Center. 2019. Antibodies. Thailand Bioresource Research Center. https://tbrcnetwork.org/antibodies/result.php (7 January 2020).

Vincent, N. F. 2013. Geminivirus protein structure and function. *Molecular Plant Pathology* 14(6): 635-649.

วันรับบทความ (Received date) : 19 พ.ย. 62

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 15 ม.ค. 63

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 22 เม.ย. 63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้