รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง
การแยกสกัดเชื้อ *Pineapple mealybug wilt-associated virus* -2 ค่อนข้างบริสุทธิ์และการผลิตโพลีโคลนอลแอนติซีรัมในหนูเม้าส์พันธุ์ BALB/cMlac

Partial purification of *Pineapple mealybug wilt-associated virus* -2 and production of polyclonal antiserum in BALB/cMlac mice

มณีรัตน์ คูหาพิทักษ์ธรรม

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๙
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ.....
สัญญาเลขที่ ๓๙ / ๒๕๕๙ (เพิ่มเติม)

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง
การแยกสกัดเชื้อ *Pineapple mealybug wilt-associated virus* -2 ค่อนข้างบริสุทธิ์และการผลิตโพลีโคลนอลแอนติซีรัมในหนูเม้าส์พันธุ์ BALB/cMlac

Partial purification of *Pineapple mealybug wilt-associated virus* -2 and production of polyclonal antiserum in BALB/cMlac mice

มณีรัตน์ คูหาพิทักษ์ธรรม

สาขาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี

ตุลาคม พ.ศ. ๒๕๕๘

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๙ มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา ๓๙ / ๒๕๕๙ (เพิ่มเติม)

บทคัดย่อ

แยกสกัดเชื้อ *Pineapple mealybug wilt associated virus*-2 (PMWaV-2) จากส่วนที่เป็นสีขาวของใบสับปะรดที่ติดเชื้อ PMWaV-2 ด้วยวิธี partial purification ตามวิธีการของ Gunasinghe และ German (1989) ตรวจสอบเชื้อ PMWaV-2 ในสารละลายด้วยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน Heat shock protein homologous (HSP70) ของเชื้อ PMWaV-2 ซึ่งจะให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 610 คู่เบส จากนั้นนำสารละลายไวรัสมาเตรียมเป็นแอนติเจนโดยผสมกับ Freund's complete adjuvant อัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และฉีดเข้าหน้าท้อง (Intraperitoneal injection, IP) หนูเม้าส์สายพันธุ์ BALB/cMlac จำนวน 2 ตัว ในครั้งแรก หลังจากนั้น 1 สัปดาห์ ฉีดเชื้อ PMWaV-2 ผสมกับ Freund's incomplete adjuvant อีก 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 1 สัปดาห์ เก็บเลือดจากหางหนูในสัปดาห์ที่ 5 หลังการฉีดครั้งแรก ตรวจหาค่าไตเตอร์ของโพลีโคลนอลแอนติซีรัมที่ผลิตได้จากหนูเม้าส์ตัวที่ 1 และ 2 โดยใช้น้ำคั้นใบสับปะรดติดเชื้อ PMWaV-2 ด้วยวิธี indirect PTA-ELISA พบว่ามีค่าไตเตอร์ เท่ากับ 1: 12,800 และ1:25,600 ตามลำดับ

Abstract

Partial purification procedure of Gunasinghe and German (1989) was used to extract *Pineapple mealybug wilt associated virus*-2 (PMWaV-2) from basal white leaf of Pattavia pineapple infection. The virus supernatant was detected by Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using primers specific to Heat shock protein homologous (HSP70) gene of PMWaV-2 yielding fragments corresponding to the virus strain at approximately 610 bp. The PMWaV-2 antigen was prepared by mixing purified virus with Freund's complete adjuvant at a ratio of 1:1 (v/v). Emulsion was Intraperitoneal injection into two BALB/cMlac mice for the first time, followed by 3 additional immunizations with purified virus mixed with Freund's incomplete adjuvant at weekly intervals. Bleeding was done at week 5. Titers of the polyclonal antiserum of mouse No.1 and 2 were determined by indirect PTA-ELISA and given 12,800 and 1:25,600, respectively.

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
สารบัญเรื่อง (Table of Contents)	(1)
สารบัญตาราง (List of Tables)	(2)
สารบัญภาพ (List of Illustration)	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)	(5)
บทนำ (Introduction)	1
- เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน	1
- ความสำคัญและที่มาของปัญหา	7
- วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	8
- ขอบเขตของโครงการวิจัย	9
- ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	9
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	10
เนื้อเรื่อง (Main body)	11
- วิธีการดำเนินการวิจัย (Materials and Method)	11
- ผลการวิจัย (Results)	16
อภิปราย/วิจารณ์ผลการทดลอง (Dissicussion)	24
สรุปผล (Summary)	25
ผลผลิต (Output)	26
รายงานสรุปการเงิน	27
บรรณานุกรม (Bibliography)	28
ภาคผนวก (Appendix)	30
ประวัตินักวิจัย	33

สารบัญตาราง (List of Tables)

ตารางที่ **หน้า**

1 แสดงผลการตรวจสอบเชื้อ PMWaV-2 จากตัวอย่างสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย จำนวน 15 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน HSP70 ของเชื้อไวรัส 18

ตารางภาคผนวกที่

1ก แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร (OD.405 nm) จากการตรวจสอบค่าไตเตอร์ (titer) ของโพลีโคลนอลแอนติซีรัมที่ผลิตได้จากหนูเม้าส์พันธุ์ BALB/cMlac) ต่อใบสับปะรดติดเชื้อ PMWaV- 2 ด้วยวิธี indirect PTA-ELISA 31

สารบัญภาพ (List of Illustration)

ภาพที่		หน้า
1	แสดงลักษณะโดยทั่วไปของต้นสับปะรด	2
2	Neighbor-joining phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HSP70 แสดงความสัมพันธ์ ของเชื้อไวรัสแต่ละจีนัสที่อยู่ในวงศ์ *Closteroviridae* วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CLUSTALW ใช้เชื้อ *Grapevine leafroll-associated virus* 1 (GLRaV-1), *Little cherry virus* 1 (LChV1) และ *Olive leaf yellowing-associated virus* (OLYaV) เป็น outgroup	5
3	โครงสร้างจีโนม (genome RNA) ของเชื้อ PMWaV-1, 2 และ 3 ซึ่งเป็น single stranded positive-sense RNA ขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส (kb) กรอบสี่เหลี่ยมสีต่างๆ แสดงบริเวณของสารพันธุกรรมที่แปลรหัสเป็นโปรตีน อักษรและตัวเลขบนกรอบสีเหลี่ยมแสดงชื่อเรียกของโปรตีน	6
4	แปลงสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียในตำบลเขาแก้ว อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี แสดงอาการผิดปกติคล้ายติดเชื้อไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรด (ก) และต้นสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียแสดงอาการแผลจุดตายสีน้ำตาลแพร่กระจายทั่วใบ อาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน เส้นใบสับปะรดมีสีแดง ปลายใบสับปะรดเหี่ยวและไหม้ (ข) ซึ่งเก็บมาใช้ในการตรวจสอบหาเชื้อ PMWaV-2 ในการศึกษาครั้งนี้	16
5	ผลผลิตดีเอ็นเอ HSP70 จากปฏิกิริยา RT-PCR ของเชื้อ PMWaV-2 ขนาดประมาณ 610 คู่เบส เปรียบเทียบกับขนาดของแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (M) ที่ใช้คือ 100 bp DNA Ladder (Invitrogen), สับปะรดปกติ (ช่องที่ 1 และช่อง 13), น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (ช่องที่ 2 และช่องที่ 14), สับปะรดตัวอย่างที่ 1-10 (ช่องที่ 3-12) และสับปะรดตัวอย่างที่ 11-15 (ช่องที่ 15-19) ตามลำดับ	17
6	แสดงส่วนของ basal white leaf ของใบสับปะรด ก. ไดอะแกรมแสดงส่วนต่างๆ ของใบสับปะรด หมายเลข 1 คือส่วนของ basal white leaf ข. ลูกศรแสดงส่วนของ basal white leaf ของใบสับปะรดซึ่งนำมาใช้ในการแยกสกัดเชื้อไวรัส	20
7	ผลการตรวจสอบขนาดและความบริสุทธิ์ของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ *Pineapple mealybug wilt associated virus*-2 ด้วยวิธี 10% SDS-PAGE ที่ทำการแยกสกัดเชื้อด้วยวิธี partial purification ตามวิธีการของ Gunasinghe และ German (1989) (ช่องที่ 2-5) ตามวิธีการของ Muharrem และคณะ (2001) (ช่องที่ 6-9) และวิธีการของ Bar-Joseph (1985) (ช่องที่ 11-14) เปรียบเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน (M) (BenchMark™ Protein Ladder) และใบสับปะรดปกติ (ช่อง 1 และ 10)	

	โดยหยอดตัวอย่างปริมาตรช่องละ 10 ไมโครลิตร, ช่องที่ 2-5 คือ Faction ที่ 1-4 ที่เก็บได้จากการแยกสกัดเชื้อไวรัสตามวิธีการของ Gunasinghe และ German (1989), ช่องที่ 6-9 คือ Faction ที่ 1-4 ที่เก็บได้จากการแยกสกัดเชื้อไวรัสตามวิธีการของ Muharrem และคณะ (2001) และช่องที่ 11-14 คือ Faction ที่ 1-4 ที่เก็บได้จากการแยกสกัดเชื้อไวรัสตามวิธีการของ Bar-Joseph (1985) ตามลำดับ	21
8	ผลการตรวจสอบเชื้อ PMWaV-2 ในสารละลาย fraction ที่ 4 ปริมาตร 500 (ช่อง 4, 6 และ 8) และ 1,000 ไมโครลิตร (ช่อง 5, 7 และ 9) จากการแยกสกัดตามวิธีการของ Gunasinghe และ German (1989) (ช่องที่ 4 และ 5) Muharrem และคณะ (2001) (ช่องที่ 6-7) และวิธีการของ Bar-Joseph (1985) (ช่องที่ 8-9) เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (M) 100 bp DNA Ladder (Invitrogen) ใบสับปะรดปกติ และน้ำกลั่น (ช่อง 1 และ 2)	23

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

As-PMWaV-2	=	polyclonal antiserum PMWaV-2
bp	=	base pair
CB	=	carbonate coating buffer
cDNA	=	complementary DNA
CFA	=	Complete Freund's Adjuvant
ELISA	=	Enzyme-linked immunosorbent assay
HSP70	=	Heat shock protein 70 gene
IFA	=	Incomplete Freund's Adjuvant
IgG	=	immunoglobulin G
indirect PTA-ELISA	=	indirect plated-trapped enzyme-linked immunosorbent assay
GAM	=	Goat anti-mouse conjugated with alkaline phosphatase
IP	=	Intraperitoneal injection
O.D. 405	=	optical density at 405 nanometer wavelength
PBS	=	Phosphate buffer saline
PBST	=	PBS+0.5% Tween 20
PMWaVs	=	*Pineapple mealybug wilt associated viruses* (strain 1, 2 and 3)
PMWaV-1	=	*Pineapple mealybug wilt associated virus* strain 1
PMWaV-2	=	*Pineapple mealybug wilt associated virus* strain 2
PMWaV-3	=	*Pineapple mealybug wilt associated virus* strain 3
PNPP	=	*p*- nitrophenyl phosphate
PEG 6000	=	polyethylene glycol 6000
RT-PCR	=	Reverse transcription polymerase chain reaction
SDS-PAGE	=	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrphoresis

(1)
บทนำ (Introduction)

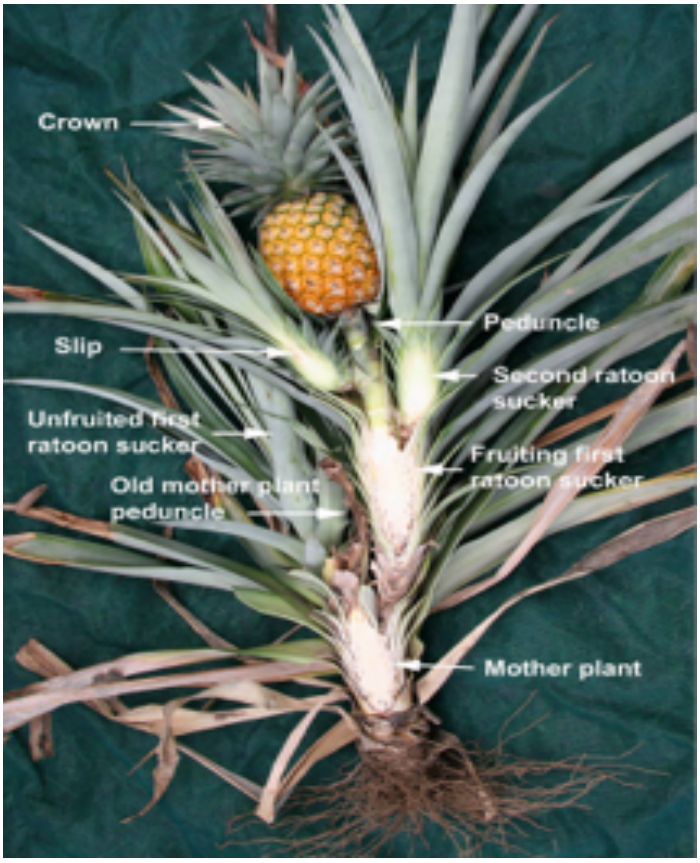
1.1 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน

ลักษณะทั่วไปของต้นสับปะรด

สับปะรด (pineapple; *Ananus comosus*) เป็นไม้ผลที่อยู่ในวงศ์ *Bromeliaceae* ซึ่งมีต้นกำเนิดในทวีปแถบอเมริกาใต้ เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่แล้วพุ่มใบจะกว้างและสูงประมาณ 80-100 เซนติเมตร รากสับปะรดเป็นระบบรากฝอย (fibrous root system) ประกอบด้วยราก adventitious root เป็นจำนวนมากเกิดจากจุดกำเนิดราก ซึ่งมีอยู่ทั่วไปตามมุมใบของลำต้นทั้งส่วนที่อยู่ใต้ผิวดินและส่วนที่อยู่เหนือผิวดิน ลำต้นของสับปะรดมีลักษณะสั้น ตรงและหนาคล้ายกระบองมีความยาวประมาณ 20-30 เซนติเมตร ส่วนที่กว้างที่สุดจะกว้างประมาณ 5 เซนติเมตร ใบสับปะรดมีลักษณะเรียวยาว ขนาดใหญ่ แข็งหนา (tough leaves) และเป็นร่องโค้ง การเรียงตัวของใบเป็นแบบเวียนรอบลำต้น มีรอบการเรียงตัว (phyllotaxy) เท่ากับ 5 /13 หรือจำนวนใบที่เกิดเวียนรอบลำต้นไปได้ 5 รอบจะมีจำนวนใบเท่ากับ 13 ใบ และใบที่ 14 จะเกิดตรงกับตำแหน่งของใบที่ 1 ลักษณะของใบที่เรียวยาวเป็นร่องโค้งและเรียงตัวเวียนรอบลำต้นสับปะรดนี้มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมที่มีน้ำน้อย ละอองฝนและน้ำค้างที่ตกลงมาสัมผัสกับพุ่มใบ จะถูกรวบรวมมาไว้ที่ส่วนโคนต้นให้รากในดินหรือรากตามมุมใบซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ การพัฒนาของผลสับปะรดเกิดขึ้นได้โดยไม่ต้องมีการผสมเกสร (parthenocarpy) ผลสับปะรดเป็นผลรวม (multiple fruit) เกิดจากการเชื่อมติดกันของผนังรังไข่และส่วนประกอบของดอกย่อยที่เรียงตัวอยู่ติดกันบนแกนกลางของช่อดอก ส่วนบนสุดของผลจะเป็นกลุ่มของใบซึ่งจะเจริญไปพร้อมๆ กับผล เรียกว่า จุก (crown) ผลสับปะรดมีรูปร่างเป็นทรงกระบอก เรียวยาว หรือรูปถังเบียร์ น้ำหนักประมาณ 0.5-3.5 กิโลกรัม บริเวณที่โคนก้านผลสับปะรดจะมีส่วนที่เรียกว่าตะเกียง (slip) ซึ่งมีลักษณะเป็นต้นสับปะรดเล็ก ๆ (ภาพที่ 1) การขยายพันธุ์สับปะรดสามารถขยายพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศโดยการใช้เมล็ดและไม่อาศัยเพศโดยใช้จุกหรือตะเกียงซึ่งเมื่อนำมาฝังกลบดินก็สามารถเจริญเป็นต้นสับปะรดได้อย่างง่าย (อัจฉราพร, 2549; Eeckenbrugge และคณะ, 2011)

ความสำคัญทางเศรษฐกิจของสับปะรดในประเทศไทย

ปัจจุบันประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกสับปะรดรายใหญ่ของโลก ทั้งชนิดที่เป็นผลสดและส่งโรงงานซึ่งมีส่วนแบ่งทางการตลาดถึงร้อยละ 45-50 โดยเฉพาะการส่งออกสับปะรดแปรรูป ได้แก่ สับปะรดกระป๋องที่สามารถสร้างรายได้เข้าประเทศปีละประมาณ 19,000 ล้านบาท น้ำสับปะรด 6,000 ล้านบาท และสับปะรดกวน 2,000 ล้านบาท ซึ่งคิดเป็นมูลค่ารวมมากกว่า 25,000 ล้านบาทต่อปี และมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นในทุกๆ ปี ตลาดนำเข้าสับปะรดที่สำคัญ ได้แก่ ประเทศอเมริกา ประเทศในแถบสหภาพยุโรป (ประเทศเนเธอร์แลนด์และเยอรมัน) และประเทศในแถบเอเชีย (ประเทศญี่ปุ่น สิงคโปร์ และมาเลเซีย) (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2555)



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะโดยทั่วไปของต้นสับปะรด
ที่มา: Eeckenbrugge และคณะ (2011)

พื้นที่เพาะปลูกสับปะรดที่สำคัญของประเทศไทย

จากความต้องการสับปะรดของตลาดโลกที่มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นประกอบกับพื้นที่ของประเทศไทยมีความเหมาะสมสามารถเพาะปลูกสับปะรดได้ทั่วทุกภาค (อัจฉราพร, 2549) ทำให้ในปัจจุบันประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกสับปะรดมากถึง 646,000 ไร่ จังหวัดที่ปลูกสับปะรดมากที่สุดในประเทศไทย อันดับหนึ่ง ได้แก่ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ มีพื้นที่การปลูกเฉลี่ยร้อยละ 47 ของพื้นที่เพาะปลูกสับปะรดทั้งหมดของประเทศไทย รองลงมาได้แก่ จังหวัดระยอง เพชรบุรี ชลบุรี ราชบุรี ตามลำดับ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2555) พันธุ์สับปะรดที่เกษตรกรนิยมปลูกได้แก่ พันธุ์ปัตตาเวียหรือพันธุ์ศรีราชา เนื่องจากสามารถขายในรูปของผลสดและส่งโรงงานอุตสาหกรรมทำสับปะรดกระป๋องเพื่อส่งออกได้ (วันเพ็ญ, 2546; อัจฉราพร, 2549)

แม้ว่าพื้นที่เพาะปลูกสับปะรดในประเทศจะเพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตามการผลิตสับปะรดเพื่อส่งโรงงานของประเทศไทยเกษตรกรยังคงประสบปัญหาด้านคุณภาพและขนาดของสับปะรดที่ผลิตได้ไม่ตรงตามความต้องการของตลาดและโรงงาน นอกจากนี้เกษตรกรยังประสบกับปัญหาโรคเหี่ยวของสับปะรด (Pineapple wilt disease) ที่มีสาเหตุเกิดจากเชื้อ *Pineapple mealybug wilt-associ-*

ated virus (PMWaVs) ซึ่งต้นสับปะรดที่ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้จะแสดงอาการเหี่ยว ชะงักการเจริญเติบโตและตายในเวลาต่อมา ทำให้เกษตรกรไม่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตสับปะรดได้และนำมาซึ่งภาวะการขาดทุนในที่สุด (วันเพ็ญ, 2546)

ไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวของสับปะรด

ไ วรัสสาเหตุโรคเหี่ยวของสับปะรดหรือ *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWaVs) มีรายงานพบครั้งแรกในสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย (*Ananas comosus* cv. Smooth Cayenne) ที่รัฐฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี ค.ศ. 1910 (Germen และคณะ 1992) ปัจจุบันพบเชื้อไวรัสชนิดนี้แพร่ระบาดและทำความเสียหายให้กับแปลงปลูกสับปะรดทั่วโลก โดยเฉพาะประเทศที่มีการปลูกสับปะรดเป็นการค้า ได้แก่ ประเทศออสเตรเลีย ไทย และคิวบา เป็นต้น ซึ่งความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสชนิดนี้ทำให้เกิดความเสียหายแก่ผลผลิตสับปะรดมากถึง 30-100% (Sether และ Hu, 2002) สำหรับประเทศไทยมีรายงานพบการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสชนิดนี้ในแปลงปลูกสับปะรดเป็นครั้งแรกที่จังหวัดชลบุรีในปี พ.ศ. 2532 ซึ่งในขณะนั้นเชื้อไวรัสได้ทำความเสียหายให้แก่ผลผลิตสับปะรดอย่างมาก (Dilokkunanant และคณะ, 1996) ต่อมาในปี พ.ศ. 2546 มีรายงานพบการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสในแปลงปลูกสับปะรดที่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และเพชรบุรี ซึ่งเป็นแหล่งปลูกสับปะรดที่สำคัญของประเทศ โ ดยพบการแพร่ระบาดของโรคมากถึง 90% นอกจากนี้พบการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสเพิ่มมากขึ้นที่จังหวัดชลบุรี ระยอง และตราด ซึ่งเป็นแหล่งปลูกสับปะรดที่สำคัญเพื่อส่งโรงงานแปรรูปของภาคตะวันออก การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสชนิดนี้ตามแหล่งปลูกสับปะรดเป็นไปอย่างรวดเร็วเนื่องจากเกษตรกรนำหน่อหรือจุกจากต้นที่เป็นโรคไปขยายพันธุ์ต่อ และพันธุ์สับปะรดที่พบว่าอ่อนแอต่อเชื้อไวรัสชนิดนี้มากที่สุดคือพันธุ์ปัตตาเวีย ซึ่งเป็นพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมปลูกมากที่สุดดังกล่าวข้างต้น (วันเพ็ญ, 2546)

สายพันธุ์เชื้อไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวและผลกระทบต่อผลผลิตสับปะรด

ปัจจุบันพบเชื้อ PMWaVs จำนวนทั้งสิ้น 5 สายพันธุ์ (strains) ได้แก่ PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3, PMWaV-4 และ PMWaV-5 แพร่กระจายอยู่ตามแหล่งปลูกสับปะรดทั่วโลก ตัวอย่างเช่น ในรัฐฮาวายมีรายงานพบเชื้อ PMWaVs จำนวน 3 สายพันธุ์ได้แก่ PMWaV-1, 2 และ 4 (Sether และคณะ, 2009) โดยเชื้อสายพันธุ์ที่ 1 และ 2 พบว่ามีการแพร่ระบาดมากที่สุดและทำความเสียหายให้กับผลผลิตสับปะรดที่ติดเชื้อมากถึง 30% และ 100% ตามลำดับ ในประเทศออสเตรเลียจะพบเชื้อ PMWaVs จำนวน 3 สายพันธุ์ดังนี้ PMWaV-1, 3 และ 5 (Sether และคณะ, 2009) ซึ่งโดยส่วนใหญ่จะพบต้นสับปะรดติดเชื้อ PMWaV-3 เพียงสายพันธุ์เดียว หรือต้นสับประรดติดเชื้อร่วมระหว่างสายพันธุ์ที่ 1 และ 3 เท่านั้น (Gambley และคณะ, 2008) อย่างไรก็ตามมีการคาดการณ์กันว่าความเสียหายของสับปะรดที่ติดเชื้อ PMWaV-3 น่าจะใกล้เคียงกับต้นสับประรดที่ติดเชื้อ PMWaV-1 ที่พบแพร่ระบาดในรัฐฮาวาย ทั้งนี้เนื่องมาจากเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ มีโครงสร้างของจีโนมคล้ายกัน (Sether และคณะ, 2009) ในประเทศคิวบาพบเชื้อ PMWaVs แพร่ระบาดจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ PMWaV-2 และ 3 โดยทำความเสียหายให้กับผลผลิตสับปะรด ลดลงมากถึง 40% สำหรับในประเทศไทยภายหลังเกิดการระบาดอย่างหนักของโรคเหี่ยวจนเกษตรกรไม่สามารถเก็บผลผลิตสับปะรดได้ ซึ่งในขณะนั้น

ทราบแต่เพียงว่าติดเชื้อไวรัส จึงได้มีการสำรวจและเก็บตัวอย่างสับปะรดที่เป็นโรคมาทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน HSP70 ของเชื้อ PMWaVs ในแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งต่อมาพบว่าต้นสับปะรดส่วนใหญ่ติดเชื้อ PMWaV-1 และ 2 (อัจฉราพร, 2549) และได้เริ่มมีการศึกษาเพื่อหาวิธีควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสชนิดนี้กันอย่างต่อเนื่อง

ลักษณะของเชื้อไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวของสับปะรดและโครงสร้างโมเลกุลของสารพันธุกรรม

เชื้อ PMWaVs จัดอยู่ในจีนัส *Ampelovirus* วงศ์ *Closteroviridae* (Sether และคณะ 2009; Hernandez และคณะ, 2010) อนุภาคมีรูปร่างเป็นท่อนยาวคด (flexuous rod-shaped) ยาวประมาณ 1400-2200 นาโนเมตร (Martelli และคณะ, 2002) สารพันธุกรรมหรือจีโนมเป็นไรโบนิวคลีอิคชนิดสายเดี่ยวเส้นบวก (single stranded positive-sense RNA) แบบ monopartite ขนาดประมาณ 14,861 นิวคลีโอไทด์ โดยมีน้ำหนักโมเลกุล 8.35x106 ดาลตัน ปลาย 5´ ของอาร์เอ็นเอเชื่อมติดอยู่กับโปรตีน VPg (genome-linked protein) ต่อจากนั้นเป็นยีนเรียงต่อกันประกอบด้วย open reading frame (ORF) จำนวน 10 ORF ได้แก่ ORF1a แปลรหัสให้ polyprotein น้ำหนักมวลโมเลกุล 204 กิโลดาลตัน ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน papain-like protease, methyltrans-ferase และ helicase domains ORF1b แปลรหัสให้โปรตีน RNA-dependent RNA polymerase น้ำหนักมวลโมเลกุล 65 กิโลดาลตัน ORF2 แปลรหัสให้โปรตีน hydrophobic protein น้ำหนักมวลโมเลกุล 5 กิโลดาลตัน ORF3 แปลรหัสให้โปรตีน heat shock protein 70 homologue น้ำหนักมวลโมเลกุล 59 กิโลดาลตัน ORF4 แปลรหัสให้โปรตีนน้ำหนักมวลโมเลกุล 46 กิโลดาลตัน ORF5 แปลรหัสให้เปลือกโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคน้ำหนักมวลโมเลกุล 34 กิโลดาลตัน ORF6 แปลรหัสให้โปรตีน diverged coat protein น้ำหนักมวลโมเลกุล 56 กิโลดาลตัน ORF7 แปลรหัสให้โปรตีนน้ำหนักมวลโมเลกุล 20 กิโลดาลตัน ORF8 แปลรหัสให้โปรตีนน้ำหนักมวลโมเลกุล 22 กิโลดาลตัน ORF9 แปลรหัสให้โปรตีนน้ำหนักมวลโมเลกุล 6 กิโลดาลตัน และตำแหน่งปลายสุดด้าน 3´ ประกอบด้วยส่วนที่ไม่แปลรหัสเป็นโปรตีน (3´- untranslated region) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 132 นิวคลีโอไทด์ (Melzer และคณะ 2001) อย่างไรก็ตามน้ำหนักมวลโมเลกุลของเปลือกโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ PMWaVs จะมีขนาดที่แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส ตัวอย่างเช่น PMWaV สายพันธุ์ที่ 1 (PMWaV-1) จะมีน้ำหนักมวลโมเลกุลประมาณ 28.1 กิโลดาลตัน (Melzer และคณะ, 2008) และ PMWaV สายพันธุ์ที่ 2 (PMWaV-2) จะมีน้ำหนักมวลโมเลกุลประมาณ 34 กิโลดาลตัน (Melzer และคณะ, 2001) และ PMWaV สายพันธุ์ที่ 3 (PMWaV-3) จะมีน้ำหนักมวลโมเลกุลประมาณ 28.8 กิโลดาลตัน (Sether และคณะ, 2009) ตามลำดับ ทั้งนี้จะพบไวรัสชนิดนี้แพร่กระจายอยู่เฉพาะภายในเซลล์ท่ออาหารของต้นสับปะรดที่ติดเชื้อเท่านั้น (Beardsley, 1993)

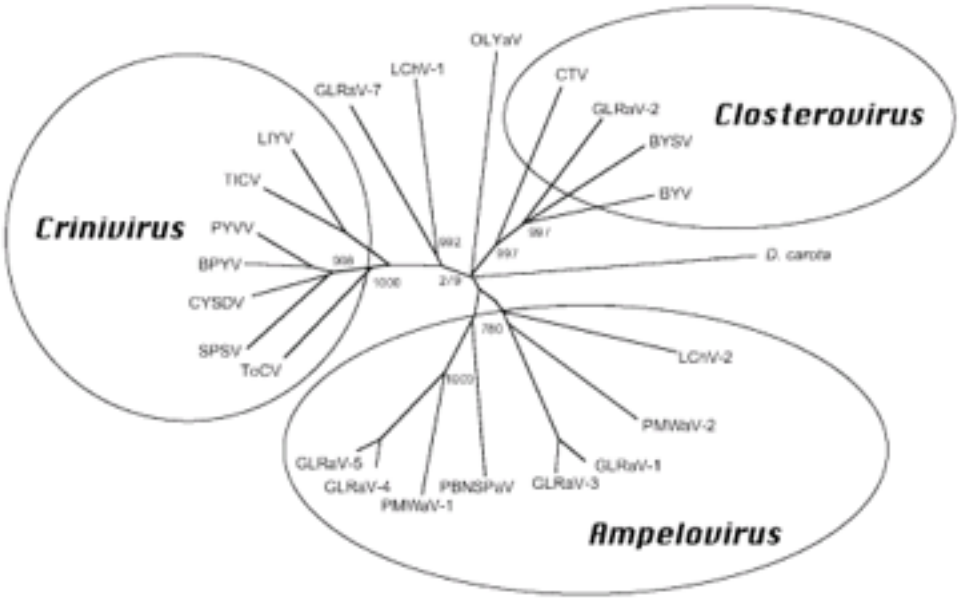
พืชอาศัย และลักษณะอาการของพืชที่ติดเชื้อไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวของสับปะรด

ในปัจจุบันมีรายงานว่าเชื้อ PMWaVs สามารถก่อโรคให้กับพืชอาศัยได้แก่ สับปะรด (*A. comosus*) ได้เพียงชนิดเดียวเท่านั้น ต้นสับปะรดที่ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้จะเริ่มแสดงอาการตั้งแต่อายุประมาณ 6 เดือน หลังปลูกจนถึงระยะเก็บเกี่ยวผลผลิต อาการเริ่มแรกจะปรากฏที่บริเวณรากซึ่งเป็น

ส่วนที่อยู่ใต้ดินโดยรากจะหยุดการเจริญเติบโตและเน่าตาย ส่งผลกระทบโดยตรงต่อต้นสับปะรดทำให้ไม่สามารถดูดซับน้ำและแร่ธาตุอาหารไปเลี้ยงลำต้นได้ ใบสับปะรดจะมีลักษณะอ่อนนิ่มและเปลี่ยนเป็นสีเขียวอ่อนหรือสีเหลือง ปลายใบแห้ง ลามเข้าสู่โคนใบ ใบลู่ลงและแผ่แบนไม่ตั้งขึ้นเหมือนใบปกติ ต้นสับปะรดแสดงอาการเหี่ยวทั้งต้นและแห้งตาย ผลสับปะรดหยุดการเจริญเติบโต ทำให้ไม่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ (จินดารัฐ, 2541; วันเพ็ญ, 2546; อัจฉราพร, 2549)

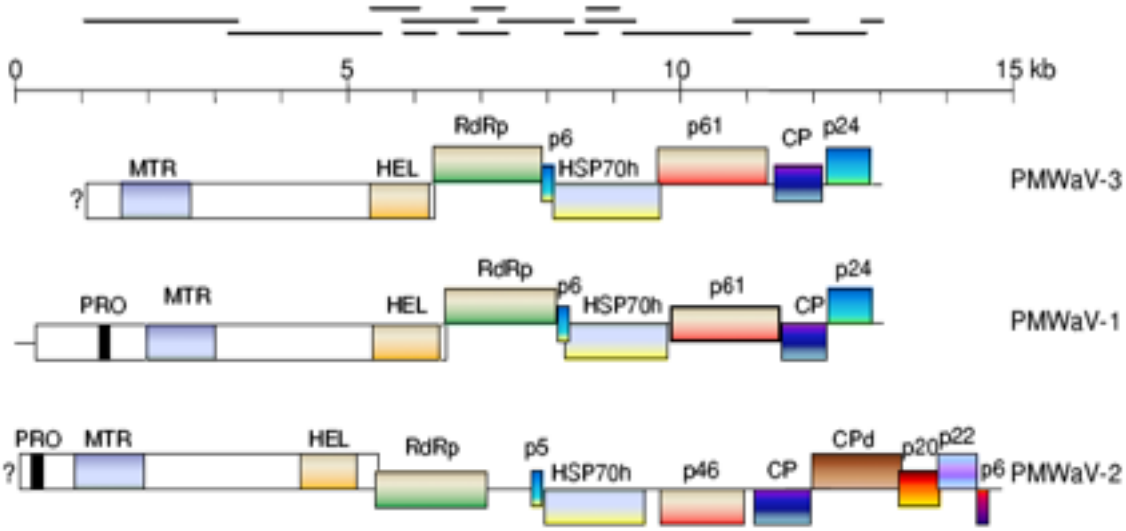
การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวของสับปะรด

เชื้อ PMWaVs นอกจากจะสามารถแพร่ระบาดไปตามแหล่งปลูกสับปะรดที่ต่างๆได้ โ ดยติดไปกับส่วนขยายพันธุ์ ได้แก่ หน่อหรือจุกของสับปะรด แล้ว นอกจากนี้เชื้อ PMWaVs ยังสามารถแพร่ระบาดไปยังต้นสับปะรดปกติได้โดยมีเพลี้ยแป้งสีชมพู (*Dysmicoccus brevipes*) และ เพลี้ยแป้งสีเทา (*D. neobrevipes*) เป็นแมลงพาหะอีกด้วย (Sether และคณะ 2005) ซึ่งเพลี้ยแป้งทั้ง 2 ชนิดนี้จะอาศัยมดหัวโต (big headed ants) มดคันไฟ (fire ants) (ชำนาญ และคณะ, 2540; Beardsley, 1993) และลม (wind-borne mealybugs) เป็นตัวช่วยพาเคลื่อนย้ายจากสับปะรดต้นหนึ่งไปยังสับปะรดอีกต้นหนึ่ง



ภาพที่ 2 Neighbor-joining phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HSP70 แสดงความสัมพันธ์ ของเชื้อไวรัสแต่ละจีนัสที่อยู่ในวงศ์ *Closteroviridae* วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CLUSTALW ใช้เชื้อ *Grapevine leafroll-associated virus* 1 (GLRaV-1), *Little cherry virus* 1 (LChV1) และ *Olive leaf yellowing-associated virus* (OLYaV) เป็น outgroup

ที่มา: Martelli และคณะ (2002)



ภาพที่ 3 โครงสร้างจีโนม (genome RNA) ของเชื้อ PMWaV-1, 2 และ 3 ซึ่งเป็น single stranded positive-sense RNA ขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส (kb) กรอบสี่เหลี่ยมสีต่างๆ แสดงบริเวณของสารพันธุกรรมที่แปลรหัสเป็นโปรตีน อักษรและตัวเลขบนกรอบสีเหลี่ยมแสดงชื่อเรียกของโปรตีน
ที่มา: Sether และคณะ (2009)

การตรวจสอบเชื้อไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวของสับปะรดด้วยเทคนิคทางซีรัมวิทยา

การตรวจสอบเพื่อคัดเลือกหน่อหรือจุกสับปะรดที่ปราศจากเชื้อ PMWaVs ก่อนนำไปปลูกในแปลง หรือเพื่อขยายพันธุ์โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการซึ่งสามารถช่วยลดการแพร่ระบาดของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสชนิดนี้ได้อีกวิธีหนึ่ง นอกเหนือจากการกำจัดวัชพืชซึ่งเป็นที่อยู่อาศัยของเพลี้ยแป้ง วิธีการตรวจสอบเชื้อ PMWaVs ที่นิยมในปัจจุบัน ได้แก่ การตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับยีน HSP70 ของเชื้อไวรัสแต่ละสายพันธุ์ (Beardsley, 1993; Hu และคณะ, 1996; Sether และคณะ, 2001) และการใช้เทคนิคทางซีรัมวิทยาโดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี (Ullman และคณะ, 1989) และโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อไวรัส (Sether และ Hu, 2002)

อย่างไรก็ตามการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยใช้เทคนิคทางซีรัมวิทยามักเป็นที่นิยมเนื่องจากมีข้อดีตรงที่เป็นวิธีการที่สามารถทำได้ง่าย ตรวจสอบตัวอย่างได้ครั้งละมากๆ ใ นระยะเวลาสั้นๆ เมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจสอบโดยใช้เทคนิค RT-PCR ซึ่งจำเป็นต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง เทคนิคทางซีรัมวิทยาที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อ PMWaVs ไ ด้แก่ Tissue blotting immunosorbent assay (TBIA) (Sether และคณะ, 2001) ซึ่งสามารถตรวจสอบเชื้อไวรัสได้จากชิ้นส่วนของพืชได้โดยตรง และ Immunosorbent electron microscopy (ISEM) (Hu และคณะ, 1996) ที่สามารถตรวจดูอนุภาค

ของเชื้อไวรัสจากตัวอย่างใบสับปะรดติดเชื้อได้ จากข้อดีของการตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิคทางซีรัมวิทยาดังกล่าวข้างต้น ด้วยเหตุนี้นักวิจัยจึงได้พยายามที่จะผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ PMWaVs พร้อมกันกับการพัฒนาเทคนิคทางซีรัมวิทยาที่มีความไว (sensitivity) สำหรับนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยใช้แอนติบอดีที่ผลิตได้และประสบความสำเร็จดังนี้

ในปี ค. ศ. 1996 Hu และคณะ ไ ด้ทำการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ PMWaV-1 และ 2 และได้รายงานความสำเร็จในการพัฒนาเทคนิค Triple antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay (TAS-ELISA) โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ เพื่อตรวจสอบเชื้อไวรัสจากรากสับปะรด

ต่อมาในปี ค.ศ. 2008 Gambley และคณะ ได้พัฒนาเทคนิค Immunomagnetic capture-reverse trancriptase-PCR (IMC-PCR) โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ PMWaV-1, 2 และ 3 และคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน RNA-dependent RNA Polymerase (RdRp) ของเชื้อไวรัสแต่ละสายพันธุ์ ตรวจสอบสับปะรดที่เป็นโรคและพบว่าสามารถตรวจสอบและจำแนกสายพันธุ์ของไวรัสชนิดนี้ได้แม้จะเจือจางน้ำคั้นใบสับปะรดถึง 1000 เท่า แล้วก็ตาม

1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

สับปะรดเป็นผลไม้เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ที่สามารถสร้างรายได้ให้กับประเทศจากการส่งออกผลิตภัณฑ์แปรรูปต่างๆ ปีละไม่ต่ำกว่า 13,000-15,000 ล้านบาท และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี ตลาดนำเข้าสับปะรดที่สำคัญ ไ ด้แก่ ประเทศสหรัฐอเมริกา สหภาพยุโรป ญี่ปุ่น และสาธารณรัฐประชาชนจีน จากรายงานความต้องการสับปะรดแปรรูปที่ยังเพิ่มสูงขึ้นของตลาดโลก ประกอบกับพื้นที่ของประเทศไทยมีความเหมาะสมสามารถเพาะปลูกสับปะรดได้ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ ทำให้พื้นที่เพาะปลูกสับปะรดในประเทศไทยเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว แหล่งเพาะปลูกสับปะรดที่สำคัญของประเทศไทยได้แก่ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี ชุมพร ชลบุรี ระยอง ภูเก็ต พังงา และจังหวัดชุมพร พันธุ์สับปะรดที่เกษตรกรนิยมปลูกได้แก่ พันธุ์ปัตตาเวียหรือพันธุ์ศรีราชา เนื่องจากสามารถขายในรูปของผลสดและส่งโรงงานอุตสาหกรรมทำสับปะรดกระป๋องเพื่อส่งออกได้ (วันเพ็ญ, 2546; อัจฉราพร, 2549)

การเพาะปลูกสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียในประเทศไทยปัจจุบันเกษตรกรมักประสบกับปัญหากับโรคเหี่ยว (Pineapple wilt disease) ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อ *Pineapple mealybug wilt-associated virus*-1 และ 2 (PMWaV-1 และ PMWaV-2) โรคนี้พบแพร่ระบาดและทำความเสียหายให้กับแปลงปลูกสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียทั่วทุกพื้นที่ของโลกรวมถึงประเทศไทย (วันเพ็ญ, 2546) ลักษณะอาการของต้นสับปะรดที่ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ในเริ่มแรกใบจะมีลักษณะอ่อนนิ่ม มีสีเขียวอ่อนหรือสีเหลือง ปลายใบแห้งตายเป็นสีน้ำตาลหรือสีแดงลามเข้าสู่โคนใบ (die back) ใบลู่ลงและแผ่แบนไม่ตั้งขึ้นเหมือนใบปกติ จากนั้นต้นสับปะรดจะเหี่ยวและแห้งตาย ส่งผลให้ผลสับปะรดหยุดการเจริญเติบโตเก็บเกี่ยวผลผลิตไม่ได้ (Dilokkunanant และคณะ, 1996) อย่างไรก็ตามในรัฐฮาวายมีรายงานว่า ต้นสับปะรดจะแสดงอาการเหี่ยวเมื่อได้รับเชื้อ PMWaV- 2 และไม่แสดงอาการของโรคหากได้รับเชื้อ PMWaV-1 เพียงชนิดเดียว (Sether และ Hu 2002) ดังนั้นหากมีการระบาดของเชื้อ PMWaV-2 นี้

ในแปลงปลูกจะทำให้เกิดความสูญเสียได้อย่างสูงกับเกษตรกรผู้ปลูกสับปะรดและส่งผลกระทบโดยตรงต่ออุตสาหกรรมสับปะรดของประเทศไทย

การคัดเลือกหน่อพันธุ์สับปะรดที่ปราศจากเชื้อ PMWaV-2 ที่รวดเร็วและแม่นยำ ก่อนนำไปขยายในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อแจกจ่ายในกับเกษตรกรต่อไปนั้น เป็นวิธีการควบคุมโรคที่ช่วยลดการแพร่ระบาดของเชื้อ PMWaV-2 และความเสียหายของผลผลิตสับปะรดจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสได้ (Sether และคณะ, 2005) การคัดเลือกหน่อพันธุ์สับปะรดที่ปราศจากเชื้อ ในปัจจุบันสามารถทำได้โดยการตรวจสอบในระดับชีวโมเลกุลด้วยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ HSP 70 homologus genes ของเชื้อไวรัส (อัจฉราพร, 2549; Hernandez และคณะ, 2010) และการตรวจสอบด้วยเทคนิคทางซีรัมวิทยา ได้แก่ เทคนิค Tissue blot immunobinding assay (TBIA) และ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) โดยใช้โพลีโคลนอลและโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส

การตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิคทางซีรัมวิทยามักได้รับความนิยมเนื่องจากมีข้อดีตรงที่เป็นวิธีการตรวจสอบเชื้อที่ทำได้ง่าย สามารถตรวจตัวอย่างได้คราวละมากๆ ภายในระยะเวลาอันสั้นและราคาไม่แพงเมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล (John, 2001) อย่างไรก็ตามการตรวจสอบเชื้อ PMWaV-2 ด้วยเทคนิคดังกล่าวสำหรับประเทศไทยยังไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสชนิดนี้จำเป็นต้องสั่งซื้อแอนติบอดีจากบริษัทต่างประเทศซึ่งมีราคาค่อนข้างสูง ประกอบกับในปัจจุบันบริษัทดังกล่าวได้ยกเลิกการผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อ PMWaV- 2 แล้ว เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวข้างต้น นักวิจัยไทยหลายท่านจึงได้มีความพยายามที่จะผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ PMWaV-2 เพื่อนำมาใช้ในการคัดเลือกต้นสับปะรดปลอดโรค แต่จากปัญหาที่เกิดขึ้นคือปริมาณของเชื้อ PMWaV-2 ในต้นพืชมีน้อย ประกอบกับการแยกสกัดเชื้อไวรัสชนิดนี้ให้บริสุทธิ์ทำได้ยาก ดังนั้นโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จึงมีคุณภาพไม่ดี กล่าวคือเกิดปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนของพืชปกติทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพืชเป็นโรคและพืชปกติได้ แม้จะนำแอนติซีรัมไปทำปฏิกิริยาข้าม (cross absorption) กับโปรตีนของพืชปกติแล้วก็ตาม เพื่อแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นในงานวิจัยนี้จึงมีความคิดที่จะผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ PMWaV-2 เนื่องจากการผลิตแอนติบดีชนิดนี้ไม่จำเป็นต้องใช้เชื้อไวรัสที่บริสุทธิ์ ใ ช้ปริมาณไวรัสสำหรับฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองปริมาณน้อย ประกอบกับหากสามารถคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา (hybridoma cell) ที่ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสได้ จะสามารถเพิ่มปริมาณแอนติบอดีได้อย่างไม่จำกัดและแอนติบดีที่ได้สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นชุดตรวจสอบ (test kits) ต่อไปได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในเบื้องต้นคือเพื่อแยกสกัดเชื้อ PMWaV-2 จากใบสับปะรดที่เป็นโรคด้วยวิธี partial purification และตรวจสอบโพลีโคลนอลแอนติซีรัมที่ได้จากการฉีดกระตุ้นเชื้อไวรัสในหนูเม้าส์ พันธุ์ BALB/cMlac ก่อนที่จะทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสในงานวิจัยต่อไป

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อแยกสกัดเชื้อ PMWaV-2 จากใบสับปะรดที่เป็นโรคด้วยวิธี partial purification
2. ตรวจสอบโพลีโคลนอลแอนติซีรัมที่ได้จากการฉีดกระตุ้นเชื้อไวรัสในหนูเม้าส์ พันธุ์ BALB/cMlac ก่อนที่จะทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสในงานวิจัยต่อไป

1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย

เก็บตัวอย่างต้นสับปะรดที่แสดงอาการของโรคเหี่ยว จากนั้นทำการคัดเลือกต้นสับปะรดที่ติดเชื้อ *Pineapple mealybug wilt- associated virus -2* (PMWaV-2) ด้วยเทคนิค Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน Heat shock proteins (HSP70) ของเชื้อไวรัส แยกสกัดเชื้อ PMWaV-2 ด้วยวิธี partial purification และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อไวรัสที่แยกสกัดได้ด้วย 10% SDS-PAGE นำสารละลายไวรัสที่เตรียมได้ไปฉีดกระตุ้นหนูเม้าส์พันธุ์ BALB/cMlac จากนั้นเก็บเลือดจากหางหนูทดลองและทำการตรวจสอบค่าไตเตอร์ของโพลีโคลนอลแอนติซีรัมที่ได้ด้วยเทคนิค PTA- indirect ELISA

1.5 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ในแหล่งปลูกสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียทั่วโลกรวมถึงประเทศไทย เกษตรกรมักประสบปัญหากับโรคเหี่ยวซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อ PMWaV-1 และ เชื้อ PMWaV-2 (วันเพ็ญ, 2546; Sether และ Hu, 2002) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าต้นสับปะรดที่ติดเชื้อ PMWaV-1 เพียงอย่างเดียวจะไม่แสดงอาการเหี่ยว แต่ถ้าหากต้นสับปะรดติดเชื้อ PMWaV-2 เพียงชนิดเดียวหรือร่วมกับเชื้อ PMWaV-1 (mixed infection) ก็จะทำให้ต้นสับปะรดแสดงอาการเหี่ยวได้ (Sether และ Hu, 2002) ถึงขั้นที่ไม่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตสับปะรดได้

แม้ว่าในปัจจุบันจะทราบว่าการควบคุมโรคนี้สามารถทำได้โดยการใช้หน่อพันธุ์สับปะรดที่ปราศจากเชื้อลงปลูกในแปลง แต่เนื่องจากต้นสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียที่ปลูกในประเทศไทยส่วนใหญ่ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ ประกอบกับการตรวจสอบเชื้อ PMWaV-2 ที่แม่นยำ ในปัจจุบันสามารถทำได้โดยการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล เช่น Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) (Gambley และคณะ, 2008) อย่างไรก็ตามเทคนิคดังกล่าวมีค่าใช้จ่ายในการตรวจตัวอย่างค่อนข้างสูงและใช้เวลานานกว่าจะทราบผล จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการคัดเลือกตัวอย่างที่ต้องใช้จำนวนมาก

การตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิคทางซีรัมวิทยา เช่น เทคนิค plated-trapped indirect enzyme-linked immunosorbant assay (PTA- indirect ELISA) โดยการใช้โพลีโคลนอลหรือโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ มีข้อดีตรงที่เป็นเทคนิคที่ใช้ค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบแต่ละครั้งค่อนข้างน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจสอบด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล และสามารถตรวจตัวอย่างพืชเป็นโรคได้คราวละมากๆ ชนิดของแอนติบดีที่นิยมใช้คือโพลีโคลนอลแอนติบอดี เนื่องจากมีวิธีการผลิตที่ง่ายและค่าใช้จ่ายไม่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จากข้อดีของการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีดังกล่าวข้างต้น ในปัจจุบันได้มีความพยายามในการผลิตแอนติบอดีชนิดดังกล่าวขึ้นมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อโรคเหี่ยวในสับปะรด แต่ทั้งนี้การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่มีคุณภาพ มีข้อจำกัดตรงที่มีความจำเป็นต้องใช้เชื้อไวรัสสำหรับฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองในปริมาณที่มากและต้องมีความบริสุทธิ์สูง ซึ่งในสภาพธรรมชาติเชื้อไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวนี้มีปริมาณน้อยในพืชและการแยกสกัดเชื้อชนิดนี้ให้บริสุทธิ์ทำได้ยาก เชื้อไวรัสมักเกิดการเกาะกลุ่มกันเอง (aggregation) หรือรวมกับชิ้นส่วนพืช ทำให้เกิดการสูญเสียเชื้อไวรัสในขั้นตอนของการสกัด ดังนั้นการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคเหี่ยว แอนติบอดีที่ได้มักมีคุณภาพไม่ดีกล่าวคือเกิดปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนของพืชและไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพืชเป็นโรคและพืชปกติได้

แม้ว่าการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง แต่ข้อดีของการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีคือปริมาณเชื้อที่ใช้ในการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองใช้ในปริมาณไม่มากเนื่องจากฉีดกระตุ้นในสัตว์ทดลองขนาดเล็ก เช่น หนูเม้าส์ พันธุ์ BALB/cMlac เชื้อที่ใช้ฉีดกระตุ้นไม่จำเป็นต้องมีความบริสุทธิ์สูง เนื่องจากในขั้นตอนของการผลิตแอนติบอดีสามารถคัดเลือกเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อที่ทำการฉีดกระตุ้นได้ นอกจากนี้หากได้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อชนิดนั้นๆ แล้ว ก็สามารถเพิ่มปริมาณแอนติบอดีเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาด้านต่างๆ ของเชื้อได้อย่างไม่จำกัด จากข้อดีของการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีดังกล่าวข้างต้น น่าจะเป็นแนวทางหนึ่งในการผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อ PMWaV-2 ที่มีคุณภาพเพื่อนำมาใช้ในการคัดเลือกต้นสับปะรดปลอดเชื้อไวรัสได้ด้วยเทคนิค PTA- indirect ELISA

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ด้านวิชาการ

ได้ผลิตภัณฑ์คือโพลีโคลนอลแอนติซีรัมจากหนูเม้าส์ ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ PMWaV-2 ที่สามารถจำหน่ายหรือพัฒนาต่อยอดเป็นชุดตรวจสอบเชื้อ PMWaV-2 ต่อไปได้

การเผยแพร่ในวารสาร

ตีพิมพ์ เผยแพร่งานวิจัยในวารสารระดับชาติ หรือนานาชาติ

หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

หน่วยงานที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้แก่ กรมส่งเสริมการเกษตร เกษตรอำเภอและจังหวัด หน่วยงานราชการที่ผลิตนักศึกษา รวมทั้งเกษตรกรผู้ปลูกสับปะรด

(2)
เนื้อเรื่อง (Main body)

2.1 วิธีการดำเนินการวิจัย (Materials and Method)

1. การเก็บตัวอย่างเชื้อ *Pineapple mealybug wilt- associated virus* -2

เก็บตัวอย่างเชื้อ *Pineapple mealybug wilt- associated virus* -2 (PMWaV-2) จากต้นสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียในพื้นที่จังหวัดแถบภาคตะวันออกของประเทศไทย ที่ใบแก่ของสับปะรดแสดงอาการแผลจุดตายสีน้ำตาลแพร่กระจายทั่วใบ ใบอ่อนแสดงอาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน เส้นใบสับปะรดแดง ปลายใบไหม้และบิด ตามการรายงานของอัจฉราพร (2549)

2. การคัดเลือกเชื้อ *Pineapple mealybug wilt- associated virus* -2 ด้วยเทคนิค Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

คัดเลือกตัวอย่างสับปะรดที่ติดเชื้อโดยการตรวจสอบใบสับปะรดที่ติดเชื้อ PMWaV-2 ด้วยเทคนิค Reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่เฉพาะกับยีน HSP70 ของเชื้อ PMWaV-2 ได้แก่ PM2*hsp*For 5'-CAT ACG AAC TAG ACT CAT ACG-3') และ PM2*hsp*Re 5'-CCA TCC ACC AAT TTT ACT AC-3' ตามวิธีการของ อัจฉราพร (2549) ตรวจดูแถบดีเอ็นเอ HSP70 ของเชื้อ PMWaV-2 ขนาดประมาณ 610 คู่เบส ภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation

2.1 การสกัดอาร์เอ็นเอรวม (total RNA) และการสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) ของยีน HSP70

บดตัวอย่างใบสับปะรดสด น้ำหนัก 0.1 กรัม ในไนโตรเจนเหลว จากนั้นสกัด Total RNA โดยใช้ Total RNA Mini Kit (Plant) (Geneaid, Taipei, Taiwan) ทำการสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) ของยีน HSP70 ของเชื้อ PMWaV-2 จาก total RNA ด้วยเทคนิค Reverse transcription (RT) โดยใช้ SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, California, USA) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้คือ นำ Total RNA ที่แยกสกัดได้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด PCR ขนาดปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 100pmol PM2*hsp*Re ที่จำเพาะกับยีน HSP70 ของเชื้อ PMWaV-2 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เติม 10mM dNTP ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และเติม RNase-free water ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลานำสารละลาย มาวางบนน้ำแข็ง เป็นเวลา 3-5 นาที จากนั้นเติมสารละลายดังต่อไปนี้ลงในปฏิกิริยาที่เตรียมไว้ข้างต้น ได้แก่

5X First-stand buffer	4	ไมโครลิตร
0.1M DTT	1	ไมโครลิตร
SuperScript III RT (200 U/μl)	1	ไมโครลิตร
RNase-free water	1	ไมโครลิตร

ผสมสารละลายให้เข้ากัน ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ Reverse transcriptase โดยการบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บ cDNA ของยีน HSP70 ของเชื้อ PMWaV-2 ที่สังเคราะห์ได้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณในขั้นตอนต่อไป

2.2 การเพิ่มปริมาณยีน HSP70 ของเชื้อไวรัส

เพิ่มปริมาณยีน HSP70 ของเชื้อ PMWaV-2 โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะดังกล่าวข้างต้นด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ตามวิธีการดังนี้คือ นำ cDNA HSP70 ของเชื้อ PMWaV-2 ที่สังเคราะห์ได้ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด PCR ใหม่ ขนาดปริมาตร 200 ไมโครลิตร การสังเคราะห์ HSP70 ของเชื้อ PMWaV- 2 เติมสารละลายดังต่อไปนี้ลงในหลอด PCR

10XPCR buffer	2	ไมโครลิตร
50mM $MgCl_2$	1	ไมโครลิตร
10mM dNTP	1	ไมโครลิตร
100 pmol PM2*hsp*For	1	ไมโครลิตร
100 pmol PM2*hsp*Re	1	ไมโครลิตร
Platinum® *Taq* DNA Polymerase	0.1	ไมโครลิตร
dH_2O	12.9	ไมโครลิตร

จะได้ปฏิกิริยา PCR รวมเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ผสมส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ให้เข้ากัน จากนั้นนำปฏิกิริยา PCR ใส่ลงในเครื่อง thermocycler ที่ตั้งโปรแกรมที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อด้วย อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ และที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอด้วย 2% agarose gel electrophoresis ใน 0.5x TBE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปแช่ในสารละลาย ethidium bromide นาน 10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอ HSP70 ของเชื้อ PMWaV-2 ภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation

3. การแยกสกัดเชื้อ *Pineapple mealybug wilt- associated virus* -2 ด้วยวิธี partial purification

แยกสกัดเชื้อ PMWaV-2 จากใบสับปะรดติดเชื้อ ด้วยวิธี partial purification 3 วิธีการ โดยวิธีการที่ 1 ทำตามวิธีการของ Gunasinghe และ German (1989) วิธีการที่ 2 ทำตามวิธีการของ Muharrem และคณะ (2001) และ วิธีการที่ 3 ทำตามวิธีการของ Bar-Joseph (1985) ซึ่งในการแยกสกัดเชื้อไวรัสในแต่ละวิธีการจะเก็บตัวอย่างตะกอนและส่วนน้ำใสเพื่อนำมาตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัส สำหรับการคัดเลือกวิธีการไปใช้ในการแยกสกัดเชื้อไวรัสสำหรับฉีดกระตุ้นหนูทดลอง

ในขั้นตอนต่อไป กำหนดสัญลักษณ์ F (Fragtion) คือตัวอย่างส่วนตะกอนหรือส่วนน้ำใสที่ทำการเก็บมาในแต่ละขั้นตอนของแต่ละวิธีการ

การแยกสกัดเชื้อไวรัสตามวิธีการของ Gunasinghe และ German (1989) เริ่มจากบดตัวอย่างใบสับปะรดในส่วน Basal white leaf ที่แช่แข็ง น้ำหนัก 10 กรัม ใน extraction buffer (500 mM Tris-HCl, pH 8.4, 4% Triton-X 100, 0.2% 2-mercaptoethanol) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร (อัตราส่วนใบพืชต่อบัฟเฟอร์เท่ากับ 1:4) จากนั้นกวนใบสับปะรดที่บดในบัฟเฟอร์ต่อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบนำมากรองผ่านผ้าขาวบาง เก็บส่วนน้ำใส นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 5,300 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ตะกอน, F1) เก็บส่วนน้ำในและนำมาปั่นตกตะกอนอีกครั้งด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 60 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ส่วนน้ำใส, F2) เทส่วนน้ำใสที่เหลือทิ้งและละลายตะกอนด้วย suspension buffer (100mM Tris-HCl, pH 8.5, 10mM $MgCl_2$) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ตะกอน, F3 และส่วนน้ำใส, F4) เก็บส่วนน้ำใสแช่เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค 10% SDS-PAGE ในขั้นตอนต่อไป

การแยกสกัดเชื้อไวรัสตามวิธีการของ Muharrem และคณะ (2001) เริ่มจากบดตัวอย่างใบสับปะรดในส่วน Basal white leaf ที่แช่แข็ง น้ำหนัก 10 กรัม ใน extraction buffer (0.05M Tris-HCl, pH 7.8 ที่ผสม 5% sucrose) 50 มิลลิลิตร (อัตราส่วนใบพืชต่อบัฟเฟอร์เท่ากับ 1:5) จากนั้นกวนใบสับปะรดที่บดในบัฟเฟอร์ต่อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบนำมากรองผ่านผ้าขาวบาง เก็บส่วนน้ำใส และนำมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatmann™ เบอร์ 4 เก็บส่วนน้ำใสแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำกากใบสับปะรดที่กรองได้มากวนใน extraction buffer ใหม่ ที่แช่เย็น (อัตราส่วนกากใบสับปะรด 1 กรัม ต่อบัฟเฟอร์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบนำมากรองผ่านผ้าขาวบาง เก็บส่วนน้ำใส ก่อนนำมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatmann™ เบอร์ 4 เก็บส่วนน้ำใสที่กรองได้นำไปรวมกับน้ำใสที่เก็บได้ก่อนหน้านี้ จากนั้นนำส่วนน้ำใสที่เก็บได้ทั้งหมดมาปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ตะกอน, F1) เก็บส่วนน้ำใสที่ได้จากนั้นเติม 6% (w/v) polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) และ 0.125 M NaCl กวนสารละลายต่อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ส่วนใส, F2) เก็บตะกอนและละลายใน suspension buffer (100mM Tris-HCl, pH 8.5, 10mM $MgCl_2$) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ตะกอน, F3 และส่วนน้ำใส, F4) เก็บส่วนน้ำใสแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การแยกสกัดเชื้อไวรัสตามวิธีการของ Bar-Joseph (1985) โดยบดตัวอย่างใบสับปะรดส่วน Basal white leaf น้ำหนัก 10 กรัม ใน extraction buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 7.8) ที่แช่เย็น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (อัตราส่วนใบพืชต่อบัฟเฟอร์เท่ากับ 1: 5) กวนน้ำคั้นใบสับปะรดบนน้ำแข็งหรือที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นกรองน้ำคั้นในสับปะรดผ่านกระดาษกรอง Whatman ™ เบอร์ 4 นำกากใบสับปะรดที่ได้จากการกรองมาละลายใน extraction buffer ที่แช่เย็น (อัตราส่วนกากใบสับปะรด 1 กรัม ต่อบัฟเฟอร์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร) กวนกากใบสับปะรดต่อบนน้ำแข็ง นาน 5 นาที เมื่อครบเวลากรองน้ำคั้นใบสับปะรดอีกครั้งด้วยกระดาษกรอง Whatmann™ เบอร์ 4 นำน้ำคั้นใบสับปะรดที่กรองได้ไปผสมรวมกับน้ำคั้นใบสับปะรดที่กรองได้ก่อนหน้านี้ จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใส ปั่นตกตะกอนส่วนน้ำใสอีกครั้งด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 9 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใส (ตะกอน, F1) เติมสารละลาย 30% PEG 6000 ที่ละลายใน 0.6 N NaCl (อัตราส่วน 30% PEG ต่อส่วนใสเท่ากับ 1: 5) และเติม 20% NaCl (อัตราส่วน 20% NaCl ต่อส่วนใสเท่ากับ 1:50) นำสารละลายไปกวนต่อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 45 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บตะกอนและละลายตะกอนด้วย 0.04 M sodium phosphate buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร กวนสารละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที (F2) นำสารละลายไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 5,700 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ตะกอน, F3 และส่วนน้ำใส , F4) เก็บส่วนน้ำใสแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อไวรัสที่แยกสกัดได้ด้วยวิธี SDS-PAGE

ตรวจความบริสุทธิ์ของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสที่แยกสกัดได้ด้วยเทคนิค sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) โดยใช้ 6% stacking gel และ 10% running gel นำตัวอย่างตะกอนและส่วนน้ำใส (Fragtion, F) ที่เก็บได้ในแต่ละขั้นตอนของแต่ละวิธีการ (ในข้อ 3) ผสมกับ 2X loading buffer (0.1% bromophenol blue, 4% SDS, 5% 2-mercaptoeethanol, 10% glycerol และ 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8) อัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5-10 นาที เมื่อครบเวลาให้รีบแช่ตัวอย่างในน้ำแข็งทันที หยอดตัวอย่างสารละลายไวรัสลงเจล ปริมาตร หลุมละ 17 ไมโครลิตร ใช้กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ 40 นาที สำหรับส่วน stacking gel และ 100 โวลต์ 150 นาที สำหรับ running gel ย้อมสีเจลด้วย staining solution (0.2% Coomassie Brilliant Blue R-250 ที่ละลายใน 50% methanol และ 7% acetic acid) นาน 10 นาที แล้วล้างเจลด้วย destaining solution (25% methanol และ 7% acetic acid) 2-3 ครั้ง หรือจนกว่าจะเห็นแถบโปรตีนชัดเจน เปรียบเทียบขนาดของแถบโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อ PMWaV-2 ที่พบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน Bench-Mark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen, Carlsbad, USA)

5. การผลิตโพลีโคลนอลแอนติซีรัมต่อเชื้อ *Pineapple mealybug wilt- associated virus -2*

5.1 การฉีดกระตุ้นหนูทดลอง

การผลิตโพลีโคลนอลแอนติซีรัมต่อเชื้อ PMWaV-2 ในงานวิจัย จะทำการฉีดสารละลายไวรัสที่แยกสกัดได้ในข้อ 3 เข้าทางหน้าท้อง (Intraperitoneal injection) ของหนูเม้าส์พันธุ์ BALB/cMlac เพศเมีย อายุ 1 เดือน ครึ่ง จำนวน 2 ตัว ซึ่งในแต่ละตัวจะมีโปรแกรมการฉีดกระตุ้น ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ดังนี้ ผสมสารละลายไวรัสกับ Freund's complete adjuvant อัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และฉีดเข้าหน้าท้อง (Intraperitoneal injection, IP) หนูเม้าส์สายพันธุ์ BALB/cMlac ในครั้งแรก หลังจากนั้น 1 สัปดาห์ ฉีดเชื้อ PMWaV-2 ผสมกับ Freund's incomplete adjuvant อีก 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 1 สัปดาห์ เก็บเลือดจากหางหนูในสัปดาห์ที่ 5 หลังการฉีดครั้งแรก ปริมาตรตัวละ 50 ไมโครลิตร ตรวจหาค่าไตเตอร์ของโพลีโคลนอลแอนติซีรัมที่ผลิตได้จากหนูเม้าส์ทั้ง 2 ตัว ด้วยวิธี indirect PTA-ELISA

5.2 การตรวจสอบค่าไตเตอร์ของโพลีโคลนอลแอนติซีรัม

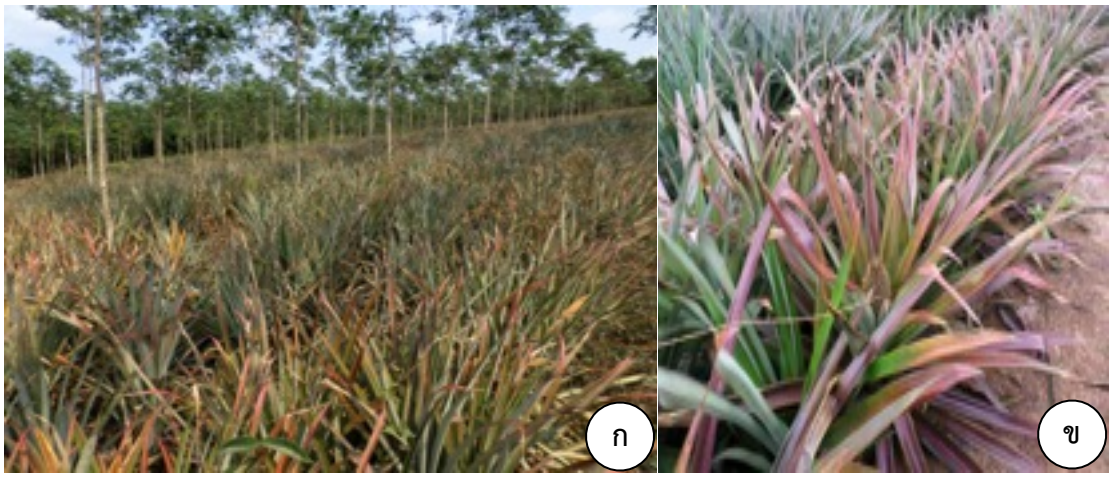
ทำการตรวจหาค่าไตเตอร์ของโพลีโคลนอลแอนติซีรัมที่ผลิตได้ในการทดลองด้วยเทคนิค indirect plated-trapped enzyme-linked immunosorbant assay (indirect PTA-ELISA) ดัดแปลงจากวิธีการของ Clark และ Adam (1977) โดยใช้โกร่งแช่เย็นบดส่วนใบสับปะรดติดเชื้อ PMWaV-2 ตามวิธีการในข้อ 3 ใน carbonate coating buffer (34mM $NaHCO_3$, 15mM Na_2CO_3; pH 9.6) อัตราส่วนใบสับปะรด 1 กรัมต่อบัฟเฟอร์ 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ใช้ปิเปตดูดน้ำคั้นพืชที่เตรียมได้ใส่ลงในหลุม ELISA plate (Costar Cat.NO.3590) ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำ ELISA plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้าง ELISA plate ด้วยบัฟเฟอร์ PBST (PBS, pH 7.4 ที่มี 0.5% Tween 20 ผสมอยู่) ปริมาตรหลุมละ 300 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นเจือจางโพลีโคลนอลแอนติซีรั่มที่เก็บได้จากหนูตัวที่ 1 และ 2 ใน blocking solution (PBS ที่มี 3% skim milk) แบบ 2-fold dilution เริ่มจาก 1: 50 จนถึง 1: 102,400 ลงในหลุม ELISA plate ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่ม ELISA plate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ล้างหลุม ELISA plate ด้วย PBST 3 ครั้ง ตามวิธีการดังกล่าวข้างต้น เติม goat anti-mouse IgG conjugated with alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) ที่เจือจางใน blocking solution อัตราส่วน 1:10,000 ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำ ELISA plate ไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้าง ELISA plate ด้วย PBST 3 ครั้ง ตรวจดูปฏิกิริยาโดยเติม substrate buffer ที่มี *p*-nitrophenyl phosphate (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หรือจนกว่าจะสังเกตเห็นปฏิกิริยา อ่านผลของปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA reader กำหนด negative control ที่ใช้ในการทดลองคือน้ำคั้นใบสับปะรดปกติ ทำปฏิกิริยากับ normal serum ที่เก็บได้จากหนู

แต่ละตัว ที่เจือจางใน blocking solution อัตราส่วน 1: 200 ค่าการเจือจางของโพลีโคลนอลแอนติซีรัมที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่เป็นบวกคือค่าที่มากกว่าค่าที่อ่านได้จาก negative control เป็น 2 เท่า

2.2 ผลการวิจัย (Results)

1. การเก็บตัวอย่างต้นสับปะรดติดเชื้อ PMWaV-2

เก็บตัวอย่างเชื้อ PMWaV-2 จากแปลงปลูกสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย จำนวน 2 แปลง ในเดือนเมษายน พ.ศ. 2559 แปลงที่ 1 เก็บที่ตำบลเขาแก้ว (ภาพที่ 4ก) และแปลงที่ 2 เก็บที่ตำบลรำพัน โดยทั้ง 2 ตำบลอยู่ในเขตอำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี แปลงที่ 1 เก็บตัวอย่างสับปะรดจำนวน 8 ตัวอย่าง และแปลงที่ 2 เก็บตัวอย่างสับปะรดจำนวน 7 ตัวอย่าง รวมตัวอย่างสับปะรดที่เก็บมาศึกษาทั้งสิ้น 15 ตัวอย่าง โดยลักษณะอาการที่นำมาศึกษาคือใบสับปะรดแสดงอาการแผลจุดตายสีน้ำตาลแพร่กระจายทั่วใบ อาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน เส้นใบสับปะรดมีสีแดง ปลายใบสับปะรดเหี่ยวและไหม้ (ภาพที่ 4ข) ตามการรายงานของ อัจฉราพร (2549)

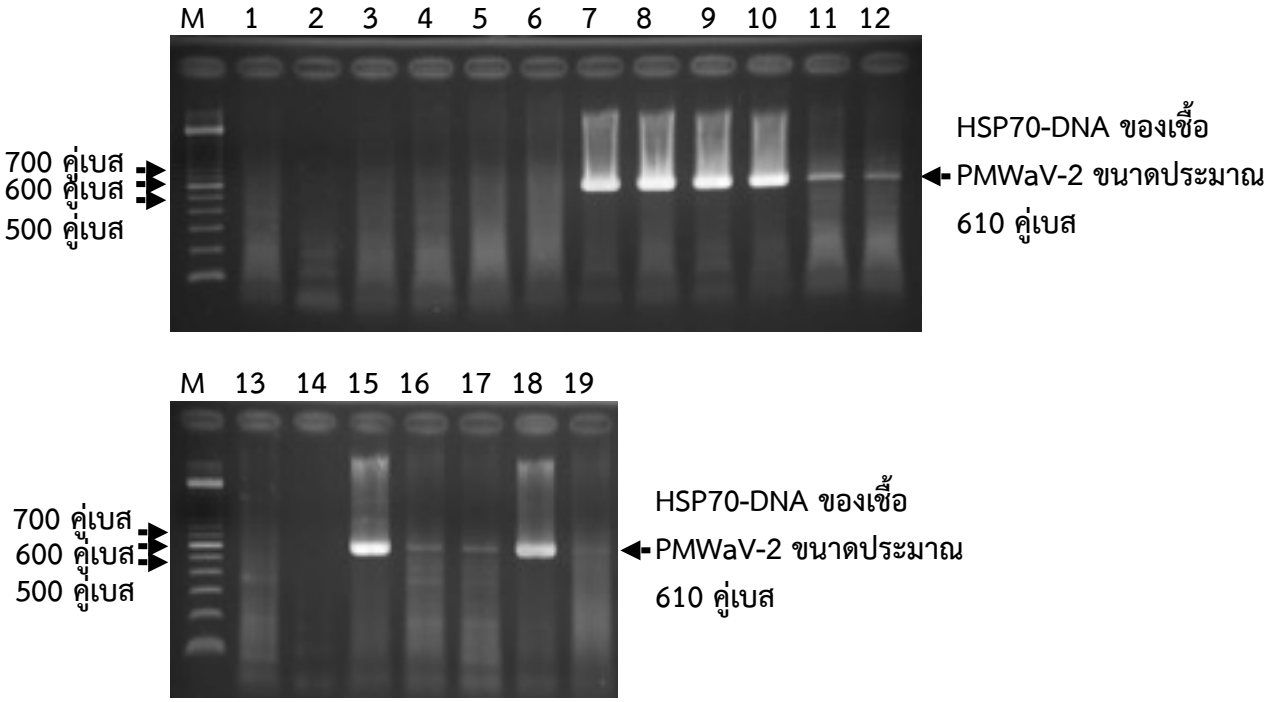


ภาพที่ 4 แปลงสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียในตำบลเขาแก้ว อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี แสดงอาการผิดปกติคล้ายติดเชื้อไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรด (ก) และต้นสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียแสดงอาการแผลจุดตายสีน้ำตาลแพร่กระจายทั่วใบ อาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน เส้นใบสับปะรดมีสีแดง ปลายใบสับปะรดเหี่ยวและไหม้ (ข) ซึ่งเก็บมาใช้ในการตรวจสอบหาเชื้อ PMWaV-2 ในการศึกษาครั้งนี้

2. การคัดเลือกเชื้อ *Pineapple mealybug wilt- associated virus* -2 ด้วยเทคนิค Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

คัดเลือกตัวอย่างต้นสับปะรดติดเชื้อ PMWaV-2 ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน HSP70 ของเชื้อ PMWaV-2 จากตัวอย่างต้นสับปะรดที่เก็บได้ทั้งหมด จำนวน 15 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างที่ 1 (S1) ตัวอย่างที่ 2 (S2) ตัวอย่างที่ 3 (S3) ตัวอย่างที่ 4 (S4) ตัวอย่างที่

5 (S5) ตัวอย่างที่ 6 (S6) ตัวอย่างที่ 7 (S7) ตัวอย่างที่ 8 (S8) ตัวอย่างที่ 9 (S9) ตัวอย่างที่ 10 (S10) ตัวอย่างที่ 11 (S11) ตัวอย่างที่ 12 (S12) ตัวอย่างที่ 13 (S13) ตัวอย่างที่ 14 (S14) และตัวอย่างที่ 15 (S15) ตามลำดับ ภายหลังจากการตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ HSP70 ของเชื้อ PMWaV-2 ด้วย 2% gel electrophoresis แล้ว พบว่าตัวอย่างสับปะรด จำนวน 11 ตัวอย่าง ได้แก่ S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11, S12, S13, S14 และ S15 ให้ผลเป็นบวกกับเชื้อ PMWaV-2 (ภาพที่ 5) โดยทั้ง 11 ตัวอย่างจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 610 คู่เบส (ภาพที่ 5) ซึ่งตัวอย่างสับปะรดที่ตรวจพบเชื้อ PMWaV-2 (ตารางที่ 1) นี้จะนำไปใช้ในขั้นตอนการแยกสกัดเชื้อไวรัสเพื่อใช้เป็นแอนติเจนในการผลิตโพลีโคลนอลแอนติซีรัมขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 5 ผลผลิตดีเอ็นเอ HSP70 จากปฏิกิริยา RT-PCR ของเชื้อ PMWaV-2 ขนาดประมาณ 610 คู่เบส เปรียบเทียบกับขนาดของแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (M) ที่ใช้คือ 100 bp DNA Ladder (Invitrogen), สับปะรดปกติ (ช่องที่ 1 และช่อง 13), น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (ช่องที่ 2 และช่องที่ 14), สับปะรดตัวอย่างที่ 1-10 (ช่องที่ 3-12) และสับปะรดตัวอย่างที่ 11-15 (ช่องที่ 15-19) ตามลำดับ

ตารางที่ 1 แสดงผลการตรวจสอบเชื้อ PMWaV-2 จากตัวอย่างสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย จำนวน 15 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน HSP70 ของเชื้อไวรัส

สับปะรด (ตัวอย่างที่)	เชื้อ PMWaV-2
1	-
2	-
3	-
4	-
5	+
6	+
7	+
8	+
9	+
10	+
11	+
12	+
13	+
14	+
15	+

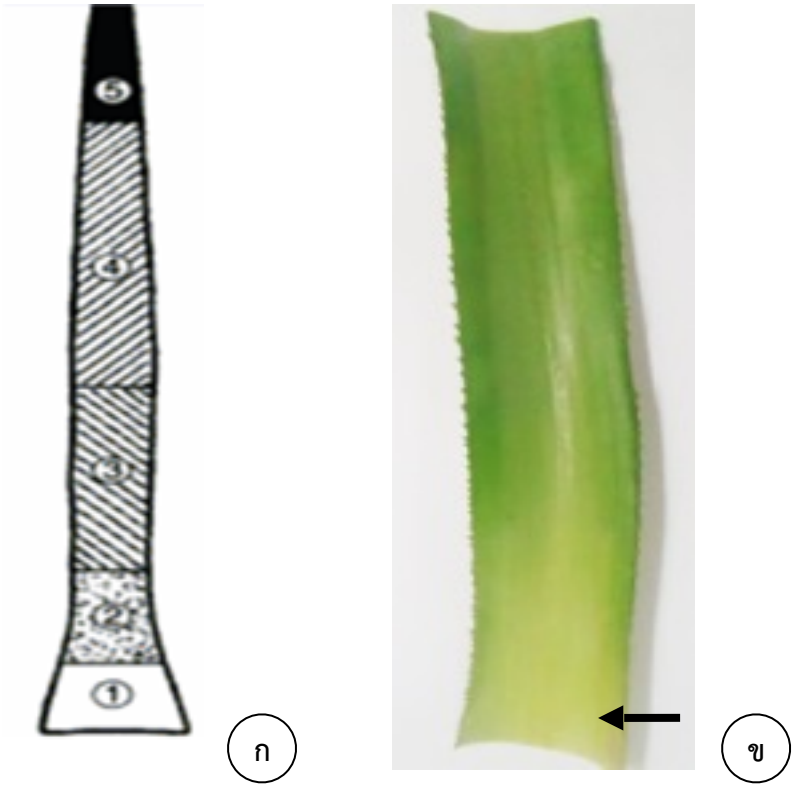
หมายเหตุ: สัญลักษณ์ – หมายถึงไม่พบเชื้อ PMWaV-2 จากการตรวจด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน HSP70 ของเชื้อไวรัส
สัญลักษณ์ + หมายถึงพบเชื้อ PMWaV-2 จากการตรวจด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน HSP70 ของเชื้อไวรัส

3. การแยกสกัดเชื้อ *Pineapple mealybug wilt- associated virus -2* ด้วยวิธี partial purification และการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อไวรัสที่แยกสกัดได้ด้วยวิธี SDS-PAGE

ในการแยกสกัดเชื้อ PMWaV-2 ด้วยวิธี partial purification ตามวิธีการของ Gunasinghe และ German (1989), Muharrem และคณะ (2001) และ Bar-Joseph และคณะ (1985) ตามลำดับ โดยใช้ส่วนใบที่เป็น basal white leaf (Sather and Hu, 2002) (ภาพที่ 6) ของใบสับปะรดใบที่ 4-6 (Sether *et al*., 2001) จากตัวอย่างต้นสับปะรดที่ตรวจพบเชื้อ PMWaV-2 ด้วยเทคนิค RT-PCR ดังกล่าวข้างต้น

การตรวจสอบเชื้อ PMWaV-2 ที่แยกสกัดได้ด้วยวิธีการต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นด้วย 10% SDS-PAGE เปรียบเทียบกับน้ำหนักมวลโมเลกุลของเชื้อไวรัสชนิดนี้ที่ได้ทำการคำนวณน้ำหนักมวลโมเลกุลของเปลือกโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคจากลำดับกรดอะมิโนว่ามีขนาดประมาณ 34.0 กิโลดาลตัน ซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้โดย Melzer และคณะ ในปี ค.ศ. 2001 ผลที่ได้ไม่พบแถบโปรตีนขนาดดังกล่าวในสารละลาย F4 ที่จะนำไปใช้ในการฉีดกระตุ้นหนูทดลองในทั้ง 3 วิธีการ (ภาพที่ 7) ทั้งนี้เมื่อพิจารณาเชื้อไวรัสในสารละลาย F1, F2 และ F3 ของทุกวิธีการที่ทำการเก็บไว้ดังกล่าวข้างต้นแล้ว พบว่ามีเพียงสารละลายในส่วนของ F3 ของวิธีการที่ 1 (Gunasinghe และ German (1989) เท่านั้น ที่ปรากฏแถบโปรตีนขนาดประมาณ 34.0 กิโลดาลตัน ชัดเจน (ภาพที่ 7 ลูกศรชี้ ช่องที่ 4) ซึ่งคาดว่าเป็นแถบโปรตีนของเปลือกโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัสชนิดนี้ ซึ่ง F3 นี้ เป็นส่วนของสารละลายที่ได้มาจากตะกอนที่แยกได้จากการปั่นตกตะกอนสารละลายไวรัสที่ละลายใน suspension buffer

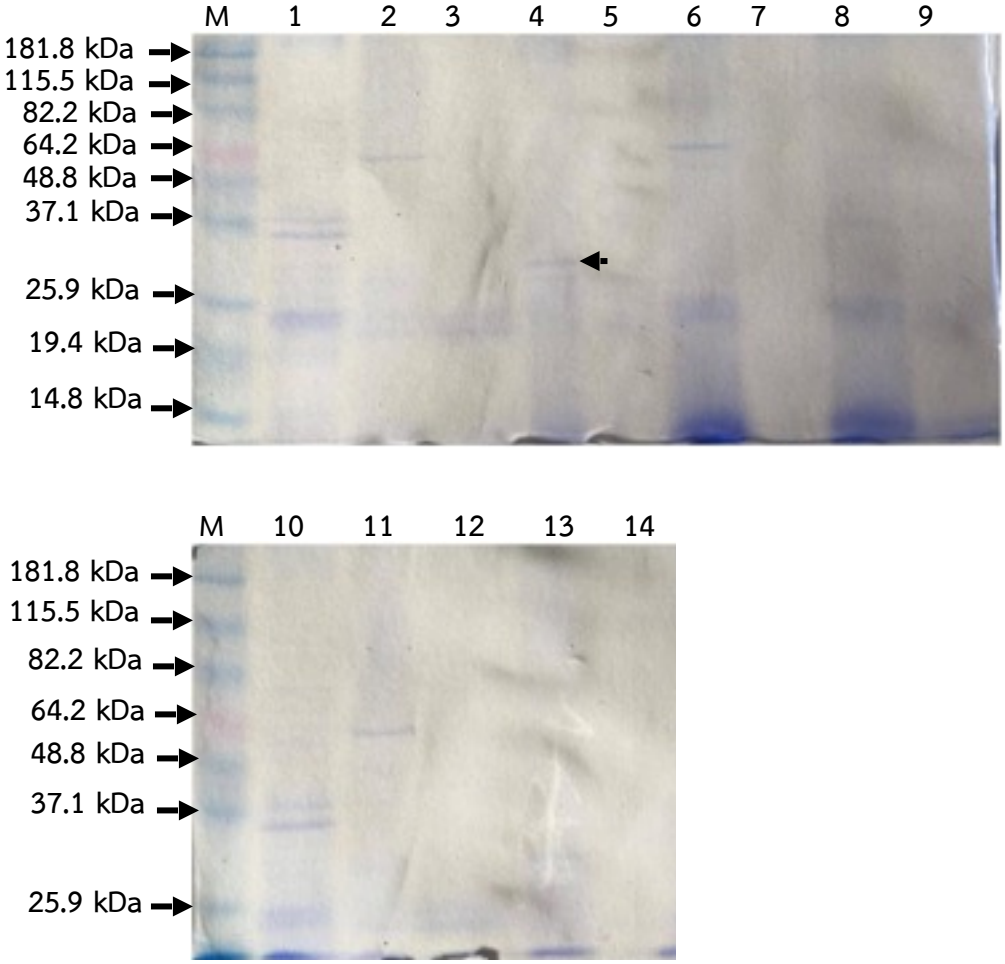
แม้ว่าการแยกสกัดเชื้อไวรัสตามวิธีการของ Gunasinghe และ German (1989) จะพบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 34.0 กิโลดาลตัน ใน fraction ที่ 3 ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นแถบโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส อย่างไรก็ตามใน fraction ดังกล่าวมีโปรตีนชนิดอื่นปะปนมาด้วย (ภาพที่ 7 ช่องที่ 4) ซึ่งหากนำไปใช้ฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองอาจทำให้ได้แอนติบอดีที่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนชนิดอื่น และอาจมีปัญหาในขั้นตอนของการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส ซึ่งจะดำเนินการในโครงการวิจัยต่อจากนี้ได้



ภาพที่ 6 แสดงส่วนของ basal white leaf ของใบสับปะรด

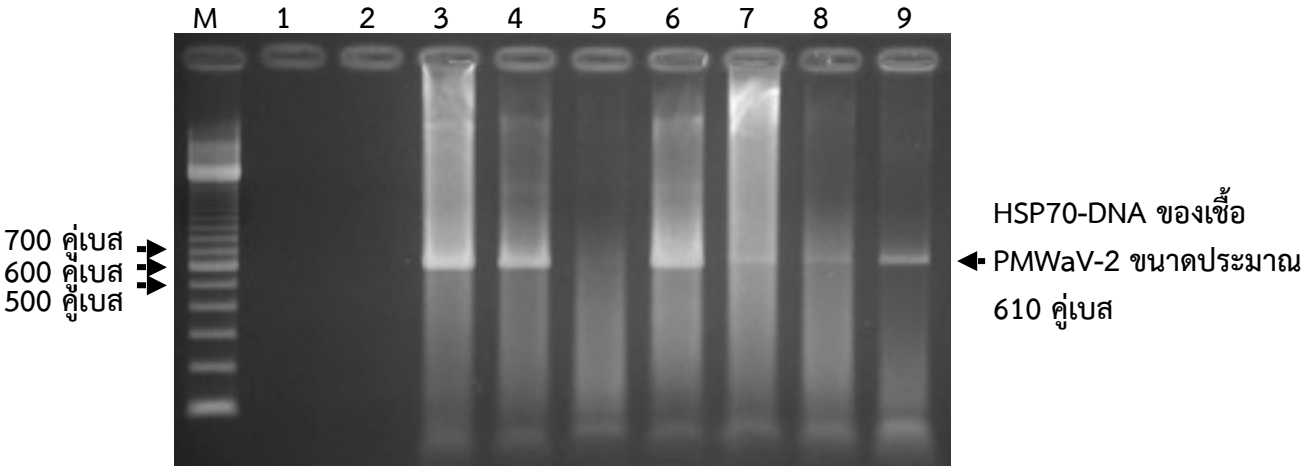
ก. ไดอะแกรมแสดงส่วนต่างๆ ของใบสับปะรด หมายเลข 1 คือส่วนของ basal white leaf ที่มา: Bartholomew *et al*. (2003)

ข. ลูกศรแสดงส่วนของ basal white leaf ของใบสับปะรดซึ่งนำมาใช้ในการแยกสกัดเชื้อไวรัส



ภาพที่ 7 ผลการตรวจสอบขนาดและความบริสุทธิ์ของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ *Pineapple mealybug wilt associated virus*-2 ด้วยวิธี 10% SDS-PAGE ที่ทำการแยกสกัดเชื้อด้วยวิธี partial purification ตามวิธีการของ Gunasinghe และ German (1989) (ช่องที่ 2-5) ตามวิธีการของ Muharrem และคณะ (2001) (ช่องที่ 6-9) และวิธีการของ Bar-Joseph (1985) (ช่องที่ 11-14) เปรียบเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน (M) (BenchMark™ Protein Ladder) และใบสับปะรดปกติ (ช่อง 1 และ 10) โ ดยหยอดตัวอย่างปริมาตรช่องละ 10 ไมโครลิตร, ช่องที่ 2-5 คือ Faction ที่ 1-4 ที่เก็บได้จากการแยกสกัดเชื้อไวรัสตามวิธีการของ Gunasinghe และ German (1989), ช่องที่ 6-9 คือ Faction ที่ 1-4 ที่เก็บได้จากการแยกสกัดเชื้อไวรัสตามวิธีการของ Muharrem และคณะ (2001) และช่องที่ 11-14 คือ Faction ที่ 1-4 ที่เก็บได้จากการแยกสกัดเชื้อไวรัสตามวิธีการของ Bar-Joseph (1985) ตามลำดับ

เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวข้างต้นผู้วิจัยจึงมุ่งประเด็นไปที่ fraction ที่ 4 ที่แยกสกัดได้ในทั้ง 3 วิธีการ ในเบื้องต้นจะทำการพิสูจน์ว่าใน fraction ที่ 4 ที่ได้จากการแยกสกัดในทั้ง 3 วิธีการนั้น มีเชื้อ PMWaV-2 อยู่หรือไม่ โดยนำสารละลายเชื้อไวรัสที่แยกสกัดได้ทั้ง 3 วิธีการ ซึ่งแต่เดิมมีปริมาตร 500 ไมโครลิตร มาทำการเจือจางในบัฟเฟอร์ให้ได้ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร (ซึ่งในการเจือจางสารละลายไวรัสที่สกัดได้ใน fraction ที่ 4 จากปริมาตร 500 ไมโครลิตร เป็นปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร นี้ผู้วิจัยพิจารณาว่าหากปริมาณเชื้อไวรัสในปริมาตร 500 ไมโครลิตร มีมากเกินไปอาจส่งผลต่อปฏิกิริยา RT-PCR ก็เป็นได้) จากนั้นนำสารละลายเชื้อไวรัสที่เจือจางได้มาทำการตรวจสอบด้วยวิธี One step reverse transcription polymerase chain reaction (SuperScript III One-Step RT-PCR, Invitrogen, USA) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ HSP70 ของเชื้อ PMWaV-2 เปรียบเทียบกับ positive control ที่ใช้คือ total RNA ที่แยกสกัดได้จากใบสับปะรดติดเชื้อ PMWaV-2 ผลการตรวจวิเคราะห์แถบ DNA ด้วย 2% agarose gel electrophoresis พบแถบ DNA ของ HSP70 ของเชื้อ PMWaV-2 ขนาดประมาณ 610 คู่เบส ใน fraction ที่ 4 ทั้ง 3 วิธีการ (ภาพที่ 8) โดยในการแยกสกัดเชื้อไวรัสวิธีการที่ 1 (ตามวิธีการของ Gunasinghe และ German, 1989) จะพบเชื้อไวรัสที่เจือจางในบัฟเฟอร์ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เท่านั้น ในขณะที่การแยกสกัดเชื้อไวรัสวิธีการที่ 2 และ 3 ซึ่งทำตามวิธีการของ Muharrem และคณะ (2001) และ Bar-Joseph (1985) ตามลำดับนั้น พบเชื้อไวรัสที่เจือจางในบัฟเฟอร์ทั้งในปริมาตร 500 ไมโครลิตร และ 1,000 ไมโครลิตร ตามลำดับ จากผลการตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค One step reverse transcription polymerase chain reaction พิสูจน์ได้ว่าในการทดลองการแยกสกัดเชื้อไวรัส PMWaV-2 ทั้ง 3 วิธีการ สามารถแยกสกัดเชื้อไวรัสได้ และการแยกสกัดเชื้อด้วยวิธีการที่ 2 และ 3 ได้ปริมาณไวรัสมากกว่าการแยกสกัดด้วยวิธีการที่ 1 อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาสีของสารละลายของเชื้อไวรัสใน fraction ที่ 4 ของทั้ง 3 วิธีการ พบว่าในการแยกสกัดเชื้อไวรัสด้วยวิธีการที่ 2 และ 3 ในทุกๆ ครั้งมักจะได้สารละลายที่มีสีเขียวอ่อนเสมอ ในขณะที่การแยกสกัดด้วยวิธีการที่ 1 จะได้สารละลายใส ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้เลือกวิธีการแยกสกัดเชื้อ PMWaV-2 เพื่อใช้ในการฉีดกระตุ้นหนูทดลอง ตามวิธีการของ Gunasinghe และ German (1989)



ภาพที่ 8 ผลการตรวจสอบเชื้อ PMWaV-2 ในสารละลาย fraction ที่ 4 ปริมาตร 500 (ช่อง 4, 6 และ 8) และ 1,000 ไมโครลิตร (ช่อง 5, 7 และ 9) จากการแยกสกัดตามวิธีการของ Gunasinghe และ German (1989) (ช่องที่ 4 และ 5) Muharrem และคณะ (2001) (ช่องที่ 6-7) และวิธีการของ Bar-Joseph (1985) (ช่องที่ 8-9) เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (M) 100 bp DNA Ladder (Invitrogen) ใบสับปะรดปกติ และน้ำกลั่น (ช่อง 1 และ 2)

4. การตรวจสอบค่าไตเตอร์ของโพลีโคลนอลแอนติซีรัมต่อเชื้อ *Pineapple mealybug wilt-associated virus -2*

การตรวจหาค่าไตเตอร์โพลีโคลนอลแอนติซีรัมต่อเชื้อ PMWaV-2 ที่เก็บได้จากหนู BALB/cMlac จำนวน 2 ตัว ด้วยเทคนิค indirect PTA-ELISA โดยเคลือบหลุม ELISA ด้วยน้ำคั้นใบสับปะรดที่ติดเชื้อ PMWaV-2 ซึ่งบดใน carbonate coating buffer โ ดยใช้อัตราส่วนของใบสับปะรดต่อบัฟเฟอร์ เท่ากับ 1: 5 ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมที่เจือจางใน blocking solution แบบ 2-fold dilution และ goat anti-mouse IgG conjugated with alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) ที่เจือจาง 1:10,000 ภายหลังตรวจสอบปฏิกิริยาโดยการเติมสับสเตรท *p*-nitrophenyl phosphate แล้วพบว่าโพลีโคลนอลแอนติซีรัมต่อเชื้อ PMWaV-2 ซึ่งเก็บได้จากหนูเม้าส์ตัวที่ 1 มีค่าเท่ากับ 1: 12,800 และ โพลีโคลนอลแอนติซีรัมต่อเชื้อ PMWaV-2 ซึ่งเก็บได้จากหนูเม้าส์ตัวที่ 2 มีค่าเท่ากับ 1:25,600 ตามลำดับ

(3)
อภิปราย/วิจารณ์ผลการทดลอง (Discussion)

ในการแยกสกัดเชื้อ PMWaV-2 ด้วยวิธี partial purification ทั้ง 3 วิธีการ ได้แก่ Gunasinghe และ German (1989), Muharrem และคณะ (2001) และ Bar-Joseph และคณะ (1985) ตามลำดับ ตรวจพบโปรตีนที่มีน้ำหนักมวลโมเลกุลใกล้เคียงกับโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ PMWaV-2 ขนาด 34.0 กิโลดาลตัน ตามการรายงานของ Melzer และคณะ (2001) ที่ทำนายได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปลือกโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส จาก Fragtion ที่ 3 (F3) ซึ่งเป็นส่วนของสารละลายที่ได้มาจากตะกอนที่แยกได้จากการปั่นตกตะกอนสารละลายไวรัสที่ละลายใน suspension buffer จากวิธีการของ Gunasinghe และ German (1989) เพียงวิธีการเดียวเท่านั้น อย่างไรก็ตามสารละลายดังกล่าวมีโปรตีนของพืชชนิดอื่นปะปนมาด้วย ซึ่งไม่เหมาะแก่การนำไปใช้ในการฉีดกระตุ้นหนูทดลองสำหรับการผลิตแอนติบอดี เนื่องจากแอนติบอดีที่ได้อาจเกิดปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนพืช เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวผู้วิจัยจึงได้ใช้เทคนิค RT-PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน HSP70 homologus genes ของเชื้อ PMWaV-2 ซึ่งมีความไวสูง (sensitivity) กว่าเทคนิค SDS-PAGE มาตรวจสอบเชื้อไวรัสในสารละลายสุดท้าย (F4) ที่ทำการแยกสกัดได้จากทั้ง 3 วิธีการ ซึ่งมีความบริสุทธิ์สูงกว่าทุก fragtion (F) ที่ทำการเก็บในแต่ละวิธีการ ผลการตรวจสอบที่ได้สามารถพิสูจน์ได้ว่าทุกวิธีที่นำมาใช้ในการแยกสกัดเชื้อไวรัสมีประสิทธิภาพและสามารถสกัดเชื้อ PMWaV-2 ได้ แต่ผลการเปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis เมื่อใช้สารละลายไวรัสที่แยกสกัดได้ในแต่ละวิธีการในปริมาตรที่เท่ากัน พบว่าปริมาณของเชื้อไวรัสในสารละลายที่แยกสกัดได้ในแต่ละวิธีการนั้นแตกต่างกัน โดยวิธีที่แยกสกัดตามวิธีการของ Muharrem และคณะ (2001) และ Bar-Joseph และคณะ (1985) ได้ปริมาณเชื้อไวรัสมากกว่าการแยกสกัดด้วยวิธีของ Gunasinghe และ German (1989) อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้วิธีการแยกสกัดเชื้อไวรัสตามวิธีการของ Gunasinghe และ German (1989) สำหรับฉีดกระตุ้นหนูทดลอง เนื่องจากสารละลายเชื้อไวรัสที่ได้มีสีใส กว่า 2 วิธีการดังกล่าวข้างต้น นอกจากนี้วิธีการของ Gunasinghe และ German (1989) ยังมีขั้นตอนการแยกสกัดและสารละลายที่ใช้ไม่ยุ่งยาก เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการของ Muharrem และคณะ (2001) และ Bar-Joseph และคณะ (1985) ทั้งนี้ในการแยกสกัดแต่ละครั้งจะทำการตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค One step reverse transcription polymerase chain reaction ก่อนเสมอ

(4)
สรุปผล (Summary)

1. การเก็บตัวอย่างเชื้อ *Pineapple mealybug wilt- associated virus -2*

เก็บตัวอย่างเชื้อ PMWaV-2 จากแปลงปลูกสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย ในอำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี จำนวนทั้งสิ้น 15 ตัวอย่าง โดยลักษณะอาการที่นำมาศึกษาคือใบสับปะรดแสดงอาการแผลจุดตายสีน้ำตาลแพร่กระจายทั่วใบ อาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน เส้นใบสับปะรดมีสีแดง ปลายใบสับปะรดเหี่ยวและไหม้

2. การคัดเลือกเชื้อ *Pineapple mealybug wilt- associated virus -2* ด้วยเทคนิค Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

ผลการคัดเลือกตัวอย่างต้นสับปะรดติดเชื้อ PMWaV-2 ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน HSP70 ของเชื้อ PMWaV-2 ได้ตัวอย่างสับปะรด จำนวน 11 ตัวอย่าง ที่ให้แถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 610 คู่เบส

3. การแยกสกัดเชื้อ *Pineapple mealybug wilt- associated virus -2* ด้วยวิธี partial purification และการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อไวรัสที่แยกสกัดได้ด้วยวิธี SDS-PAGE

แยกสกัดเชื้อ PMWaV-2 ด้วยวิธี partial purification ทั้งหมด 3 วิธีการ ได้แก่ วิธีการของ Gunasinghe และ German (1989) วิธีการของ Muharrem และคณะ (2001) และ วิธีการของ Bar-Joseph และคณะ (1985) ตามลำดับ โดยใช้ส่วนใบที่เป็น basal white leaf ของใบสับปะรดใบที่ 4-6 ผลการตรวจสอบน้ำหนักมวลโมเลกุลของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ PMWaV-2 ที่ขนาด 34.0 กิโลดาลตัน และความบริสุทธิ์ของสารละลายไวรัสที่แยกสกัดในแต่ละวิธี ด้วยเทคนิค 10%SDS-PAGE ไม่พบแถบโปรตีนใดในสารละลายไวรัส ทั้ง 3 วิธีการ ภายหลังตรวจสอบเชื้อไวรัสในสารละลายด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ HSP70 ของเชื้อ PMWaV-2 พบว่าสารละลายไวรัสทั้ง 3 ตัวอย่าง ให้แถบดีเอ็นเอของ HSP70 ขนาด 610 คู่เบส แสดงว่าทั้ง 3 วิธีการ สามารถแยกสกัดเชื้อไวรัสได้ อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้วิธีการแยกสกัดเชื้อไวรัส ตามวิธีการของ Gunasinghe และ German (1989) สำหรับเตรียมแอนติเจนเพื่อใช้ฉีดกระตุ้นหนูทดลอง เนื่องจากได้สารละลายใสไม่มีสี เมื่อเปรียบเทียบกับการแยกสกัดตามวิธีการของ Muharrem และคณะ (2001) และ วิธีการของ Bar-Joseph และคณะ (1985) ที่พบว่าสารละลายที่ได้มีสีเขียวของพืชปะปนมา ซึ่งไม่เหมาะแก่การนำไปใช้ในการฉีกกระตุ้นสัตว์ทดลองเพื่อผลิตแอนติบอดี

4. การตรวจสอบค่าไตเตอร์ของโพลีโคลนอลแอนติซีรัมต่อเชื้อ *Pineapple mealybug wilt-associated virus -2*

ผลการตรวจหาค่าไตเตอร์โพลีโคลนอลแอนติซีรัมต่อเชื้อ PMWaV-2 ที่เก็บได้จากหนู BALB/cMlac จำนวน 2 ตัว ด้วยเทคนิค indirect PTA-ELISA โดยเคลือบหลุม ELISA ด้วยน้ำคั้นใบสับปะรดที่ติดเชื้อ PMWaV-2 พบว่าโพลีโคลนอลแอนติซีรัมต่อเชื้อ PMWaV-2 ซึ่งเก็บได้จากหนูเม้าส์ตัวที่ 1 มีค่าเท่ากับ 1: 12,800 และ โพลีโคลนอลแอนติซีรัมต่อเชื้อ PMWaV-2 ซึ่งเก็บได้จากหนูเม้าส์ตัวที่ 2 มีค่าเท่ากับ 1:25,600 ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

- หากโครงการวิจัยนี้ สามารถนำไปต่อยอดใช้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ PMWaV-2 ได้ จะสามารถพัฒนาชุดตรวจสอบเชื้อไวรัสแบบง่ายและรวดเร็ว ซึ่งจะมีประโยชน์ต่อเกษตรกรผู้ปลูกสับปะรด และอุตสาหกรรมการส่งออกสับปะรดกระป๋องของไทยเป็นอย่างมาก

(5)
ผลผลิต (Output)

- ได้ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับชาติ
- ได้หนูทดลองซึ่งสามารถนำไปใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ PMWaV-2

รายงานสรุปการเงิน
เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย (NRMS 13 หลัก).....สัญญาเลขที่ 39/2559 (เพิ่มเติม)
โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 (เพิ่มเติม)
มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ: การแยกสกัดเชื้อ *Pineapple mealybug wilt-associated virus* -2 ค่อนข้างบริสุทธิ์และการผลิตโพลีโคลนอลแอนติซีรัมในหนูเม้าส์พันธุ์ BALB/cMlac
ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน (อ./ดร./ผศ./รศ./ศ.)...มณีรัตน์ คูหาพิทักษ์ธรรม.....
รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ (วัน/เดือน/ปี) 1 ตุลาคม พ.ศ. 2558
ถึงวันที่ (วัน/เดือน/ปี) 30 กันยายน พ.ศ. 2559
ระยะเวลาดำเนินการ...๑.....ปี .....-..... เดือน ตั้งแต่วันที่ (วัน/เดือน/ปี) 1 ตุลาคม พ.ศ. 2558
รายรับ
จำนวนเงินที่ได้รับ
งวดที่ 1 (50%) .....220,500..... บาท เมื่อวัน เดือน ปี 26 พฤษภาคม พ.ศ. 2559
งวดที่ 2 (40%) .....176,400.....บาท เมื่อวัน เดือน ปี..12 มกราคม พ.ศ. 2560
งวดที่ 3 (10%) .....44,100..... บาท เมื่อวัน เดือน ปี.....-.....
รวม .....441,000 บาท (สี่แสนสี่หมื่นหนึ่งพันบาทถ้วน).....

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	36,000	36,000	0
2. ค่าจ้าง	159,600	159,600	0
3. ค่าวัสดุ	7,000	7,000	0
4. ค่าใช้สอย	192,300	192,300	0
5. ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ 6.1 ค่าโทรศัพท์ ค่าไปรษณีย์ 6.2 ค่าบำรุงสถาบัน ร้อยละ 10	 2,000 44,100	 2,000 44,100	 0 0
รวม	441,000	441,000	0

(.....)
ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

บรรณานุกรม (Bibliography)

จินดารัฐ วีระวุฒิ. 2541. **สับปะรดและสรีรวิทยาของสับปะรด**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

ชำนาญ พิทักษ์ อนุวัฒน์ จันทรสุวรรณ และอรนุช กองกาญจนะ. 2540. **การป้องกันกำจัดมดในไร่สับปะรด**. รายงานผลงานวิจัย กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูข้าวโพดและพืชไร่อื่นๆ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 21 หน้า

วันเพ็ญ ศรีทองชัย. 2546. โรคเหี่ยว: ภัยคุกคามต่อการปลูกสับปะรดของไทย. **วารสารโรคพืช** 17: 48-53.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2555. **สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้มปี 2555.** กองวิจัยการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

อัจฉราพร ศรีจุดานุ. 2549. **การตรวจสอบและการแสดงออกของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวของสับปะรดในประเทศไทย.** วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 66 หน้า

Bar-Joseph, M., D.J. Gumpf, J.A. Dodds, A. Rosner and I. Ginzburg. 1985. A simple purification method for *Citrus tristeza virus* and estimation of its genome size. **Phytopathology** 75: 195-198.

.Beardsley, J.W. 1993. The pineapple mealybug complex; taxonomy, distribution and host relationships. **Acta Hort.** 334: 383-386.

Clark, M.F. and A. N. Adam. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology** 34: 475-483.

Dilokkunanant, U., S. Kladpan, R. Prateepasen and U. Suwanwong. 1996. Pineapple wilt disease in Thailand. *Thai J. Agricultural. Sci.* 29: 337-348.

Eeckenbrugge, G.C., G.M. Sanewski, M.K. Smith, M.F. Duval and F. Leal. 2011. Ananas. In: Wild crop relatives: genomic and breeding resources. Tropical and subtropical fruits (Kole C., Ed.), pp. 21-41. Springer, Berlin.

Gambley, C.F., V. Steele, A.D.W. Geering and J.E. Thomas. 2008. The genetic diversity of ampeloviruses in Australian pineapples and their association with mealybug wilt disease. Australasian Plant Pathology 37: 95-105.

Germen, T.L., D.E. Ullman and U.B. Gunasinghe. 1992. Mealybug wilt of pineapple. **Advances in Disease Vector Research** 9: 241-259.

Hernandez, L., P.L. Ramos, M. Rodriguez, I. Pena and J.M. Perez. 2010. First report of *Pineapple mealybug wilt associated virus*-3 infecting pineapple in Cuba. **New Disease Reports.** 22: 18. [doi:10.5197/j.2044-0588.2010.022.018]

_____, Sether, D.M. and Ullman, D.E. 1996. Detection of pineapple closterovirus in pineapple plants and mealybugs using monoclonal antibodies. **Plant Pathol.** 45: 829-836.

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

Martelli, G.P., A.A. Agranovsky, M. Bar-Joseph, D. Boscia, T. Candresses, R.H.A. Coutts, V.V. Dolja, B.W. Falk, D. Gonsalves, W. Jelkman, A.V. Karasev, A. Minafra, S. Namba, H.J. Vetten, G.C. Wisler and N. Yoshikawa. 2002**.** The family C*losteroviridae* revised. *Arch*. *Virol*. 147: 2039-2044.

Melzer, M. J., A.V. Karasev, D.M. Sether and J.S. Hu. 2001. Nucleotide sequence, genome organization and phylogenetic analysis of *Pineapple mealybug wilt-associated virus*-2. *J. Gen. Virol*. 82: 1-7.

_____, Sether, D. M., Karasev, A. V., Borth, W. and Hu, J. S. 2008. Complete nucleotide sequence and genome organization of *Pineapple mealybug wilt-associated virus*-1. *Arch*. *Virol*. 153:707-714.

_____ , A.V. Karasev, C. Okumura, C. Arakawa, F. Zee, M.M. Kislan, J.L. Busto and J.S. Hu. 2001. Differentiation, distribution, and elimination of two different *Pineapple mealybug wilt-associated viruses* found in pineapple. **Plant Dis**. 85: 856-864.

_____, and J.S. Hu. 2002. Yield impact and spread of *Pineapple mealybug wilt associated virus*-2 and mealybug wilt of pineapple in Hawaii. **Plant Dis**. 86: 867-874.

_____, M.J. Melzer, J. Busto, F. Zee and J.S. Hu. 2005. Diversity and mealybug transmissibility of ampeloviruses in pineapple. **Plant Dis.** 89:450-456.

_____, M.J. Melzer, W.B. Borth and J.S. Hu. 2009. Genome organization and phylogenetic relationship of *Pineapple mealybug wilt associated virus*-3 with family *Closteroviridae* members. **Virus Genes** 38:414-420

Ullman, D.E., T.L. German, U.B. Gunasinghe and R.H. Ebesu. 1989. Serology of a closteroviruslike particle associated with mealybug wilt of pineapple. **Phytopathology** 79: 1341-1345.

ภาคผนวก (Appendix)

ภาคผนวก ก.

ตารางที่ 1ก แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร (OD.405 nm) จากการตรวจสอบค่าไตเตอร์ (titer) ของโพลีโคลนอลแอนติซีรัมที่ผลิตได้จากหนูเม้าส์พันธุ์ BALB/cMlac) ต่อใบสับปะรดติดเชื้อ PMWaV- 2 ด้วยวิธี indirect PTA-ELISA

ค่าการเจือจางของน้ำคั้นใบสับปะรดติดเชื้อ PMWaV-2	**ค่า OD.405 nm**	
	โพลีโคลนอลแอนติซีรัม จากหนูเม้าส์ ตัวที่ 1	**โพลีโคลนอลแอนติซีรัม จากหนูเม้าส์ ตัวที่ 2**
1:50	**3.522**	**3.466**
1:100	**3.487**	**3.442**
1:200	**3.490**	**3.372**
1:400	**3.538**	**3.129**
1:800	**3.358**	**2.394**
1:1,600	**2.642**	**1.605**
1:3,200	**1.768**	**0.959**
1:6,400	**1.032**	**0.581**
1:12,800	**0.641**	**0.281**
1:25,600	**0.408**	**0.168**
1:512,000	**0.274**	**0.100**

หมายเหตุ: negative control ของ PAb หนูเม้าส์ตัวที่ 1 คือ ค่า OD.405 nm ของ normal serum จากหนูเม้าส์ ตัวที่ 1 ทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นใบสับปะรดปกติ ซึ่งมีเท่ากับ 0.280
negative control ของ PAb หนูเม้าส์ตัวที่ 2 คือ ค่า OD.405 nm ของ normal serum จากหนูเม้าส์ ตัวที่ 2 ทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นใบสับปะรดปกติ มีค่าเท่ากับ 0.019

ภาคผนวก ข.

การเตรียมบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ที่ใช้ในเทคนิค indirect PTA-ELISA (Clark และ Adam, 1977)

1. Phosphate buffer saline (PBS); pH 7.4

NaCl	8.0	กรัม
$Na_2HPO_4.12H_2O$	2.9	กรัม
KH_2PO_4	0.2	กรัม
KCl	0.2	กรัม

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

2. Carbonate coating buffer; pH 9.6 (CB)

$NaHCO_3$	2.93	กรัม
Na_2CO_3	1.59	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร		

ปรับ pH ให้ได้ 9.6 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

3. Washing buffer (PBST)

PBS	100	มิลลิลิตร
Tween 20	0.5	มิลลิลิตร

สามารถเตรียมเป็นความเข้มข้น 10xPBST และ autoclave ก่อนเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสได้

4. Substrate buffer; pH 9.8

Diethanolamine	97	มิลลิลิตร
Sodium azide	0.2	กรัม
$MgCl_2.6H_2O$	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 9.8 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร เก็บแช่เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด