

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ได้สนับสนุนทุนวิจัย ให้แนวคิด และแนวทางปฏิบัติที่มีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการพัฒนางานวิจัย ทำให้ได้ใช้ความรู้และทักษะที่ได้เรียนรู้ในระดับปริญญาเอกได้อย่างต่อเนื่องมาจนถึงปัจจุบัน

ขอขอบพระคุณที่ปรึกษาโครงการวิจัย ผศ. ดร.พิศสุวรรณ เขียมสมบัติ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้ช่วยเหลือวัสดุสิ่งของที่ใช้ในการวิจัยและให้คำปรึกษาในทุกๆ ด้านโดยไม่มีเบื่อหน่าย เป็นขวัญและกำลังใจให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร.โสภณ วงศ์แก้ว ที่ได้ให้ตัวอย่างเชื้อ peanut stripe virus สายพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. วัลลา คิณธุพงษ์พิชญ์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ อนุเคราะห์เครื่องมือเครื่องใช้และสารเคมีที่จำเป็นบางอย่างในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ Dr. Ralf Dietzgen แห่ง University of Queensland, Australia ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ PST-primers และคำแนะนำเกี่ยวกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ขอขอบคุณองค์การส่งเสริมความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย (JSPS) ภายใต้อาณัติของสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้ทุนไปศึกษาและปฏิบัติงานวิจัย ณ ประเทศญี่ปุ่น ภายใต้ทุน Long Term Invitation Program ระหว่างวันที่ 15 ตุลาคม 2540- 31 มีนาคม 2541 และขอบพระคุณ Professor Masato Ikegami ที่ให้โอกาสได้เรียนรู้เทคนิคการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เครื่อง Automated DNA sequencing และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ DNASIS

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ได้ให้การสนับสนุนด้านสถานที่ ครุภัณฑ์และวัสดุอุปกรณ์ที่จำเป็นในการวิจัยบางอย่างจนสิ้นสุดโครงการ

ดร.เพชรรัตน์ ศิริวงศ์

ตุลาคม 2543

9. ผลการวิจัย

9.1 การก่อให้เกิดโรคของเชื้อ PSIV-severe necrotic strain

PSIV-SN ทำให้เกิดอาการเนื้อเยื่อตายแบบรุนแรงในถั่วลิสง ใบด่างไม่ชัดเจนและบิดเบี้ยว ต้นแคระแกร็น ทำให้ต้นเหี่ยวตายได้ถ้าหากพืชได้รับเชื้อในขณะที่ยังเป็นต้นอ่อน

9.2 การแยกไวรัสบริสุทธิ์

สามารถแยกสกัดอนุภาค PSIV-SN บริสุทธิ์ได้จากใบถั่วลิสงเป็นโรค โดยได้ปริมาณไวรัสบริสุทธิ์ 5-8 มก. จากใบถั่วลิสง 100 กรัม

9.3 องค์ประกอบสำคัญของอนุภาคไวรัส

อนุภาค PSIV-SN ประกอบด้วยจีโนมแบบ single stranded RNA มีโปรตีนห่อหุ้มที่ประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อยเพียงชนิดเดียว น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 32 กิโลดาลตัน

9.4 การโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มและยีน replicase ของ PSIV-SN

สามารถโคลนยีนทางด้านปลาย 3' ของจีโนม PSIV-SN โดยใช้เทคนิค RT-PCR ร่วมกับ cDNA cloning แบบมาตรฐาน ทำให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวน 2,793 นิวคลีโอไทด์ บรรจุข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติประจำของเชื้อในส่วนต่างๆ ดังนี้

- (1) บางส่วนของยีน small nuclear inclusion proteinase (Nla gene) จำนวน 114 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนได้จำนวน 38 เรสิดิวซ์
- (2) ยีน replicase (large nuclear inclusion protein, Nlb gene) จำนวนทั้งสิ้น 1,548 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนได้จำนวน 561 เรสิดิวซ์ น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนเท่ากับ 59,336.76 ดาลตัน
- (3) ยีนโปรตีนห่อหุ้ม (CP gene) จำนวน 861 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งรวมทั้ง termination codon TAG แปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนได้จำนวน 286 เรสิดิวซ์ น้ำหนักโมเลกุลโปรตีนเท่ากับ 32,035.35 ดาลตัน
- (4) 3' non-coding region (3' NCR) จำนวน 253 นิวคลีโอไทด์
- (5) poly A tail 17 นิวคลีโอไทด์

9.5 การศึกษาความสัมพันธ์ของ PSIV-SN กับ PSIV สายพันธุ์อื่นและโททิวไรสนิคอื่น ๆ

เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของโปรตีนห่อหุ้มและลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน 3' non coding region สามารถจำแนก PSIV-SN เป็นสายพันธุ์ใหม่ของ PSIV สมาชิกของวงศ์ Potyviridae โดยมีความคล้ายคลึงกับสายพันธุ์ PSIV-T6 มากที่สุด

9.6 เทคนิคหรือวิธีการที่พัฒนาได้จากโครงการวิจัยนี้

การแยกอนุภาค PSIV-SN จากใบถั่วลิสงเป็นโรค, การโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มและยีน replicase โดยใช้วิธีมาตรฐาน (oligo dT primer) และ RT-PCR โดยใช้ specific/degenerate primers, การคัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลน, การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม DNASIS(version 3.7)

Abstract

Project Code : PDF/ 82 / 2540

Project Title : cDNA cloning of coat protein and replicase genes of peanut stripe virus-severe necrotic strain in peanut

Investigators: 1) Dr. Petcharat Siriwong (Researcher)

Dept of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University

2) Associate Prof. Dr. Pissawan Chiemsombat (Mentor)

Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University

E-mail Address : petsir@kku1.kku.ac.th

Project Period : August 1997 - October 2000

Objectives : To clone and determine nucleotide sequence of coat protein and replicase genes of peanut stripe virus-severe necrotic strain (PStV-SN), and to initiate the research works on molecular biology of plant viruses at Dept. of Plant Pathology, Khon Kaen Uni.

Methodology : PStV-SN was propagated on peanut tainan 9 plants. Type of disease symptom was observed. The infected leaves were harvested at 14-21 days after inoculation for virus purification. Type of nucleic acid extracted from PStV-SN particles was determined by enzymatic reaction. Species and molecular weight of coat protein subunits were studied by SDS-PAGE. Standard cDNA cloning and RT-PCR cloning were carried out using PStV-SN RNA as template. Nucleotide sequence of coat protein and replicase genes were examined and analysed using DNASIS version 3.7 .

Result : PStV-SN caused severe necrotic, mottle, leaf distortion, stunt and sometimes rapidly wilt on peanut Tainan 9. Purified virus was achieved 8-9 mg from 100 gm of infected peanut leaves. The virus particle is flexuous rod shape, single strand RNA genome, one species of coat protein subunit approximated 32 kDa. Total of 2,793 nucleotides of 3'-terminal region of virus genome were sequenced, including partial of Nla gene(114 nt), replicase gene (1,548 nt), coat protein gene (861 nt), 3' non-coding region (3' NCR) (253 nt) and poly A tail (17 nt), respectively.

Discussion conclusion : PStV-SN belongs to the family Potyviridae. PStV-SN RNA contains 861 nt coding for coat protein and 1,548 nt coding for replicase genes. Based upon nucleotide and amino acid sequences comparison, PStV-SN is classified as a new strain of PStV.

Further Implication : Improvement of commercial Thai-peanut cultivars for resistant to PStV by genetically engineered with coat protein gene and/or replicase gene of PStV-SN.

Keywords : peanut stripe virus-severe necrotic strain, coat protein gene, replicase gene

หน้าสรุปโครงการวิจัย (Executive summary)

ทุนวิจัยหลังปริญญาเอก

1. ชื่อโครงการ

การโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มและยีน replicase ของเชื้อ peanut stripe virus สายพันธุ์เนื้อเยื่อตายแบบรุนแรงในถั่วลิสง

cDNA cloning of coat protein and replicase genes of peanut stripe virus-severe necrotic strain in peanut

2. ผู้ดำเนินการวิจัย: ดร. เพชรรัตน์ ศิริวงศ์ (Dr. Petcharat Siri Wong)

ตำแหน่ง : อาจารย์ ระดับ 7

ที่ทำงาน : ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.
เมือง จ.ขอนแก่น 40002

โทรศัพท์/โทรสาร : (043) 343114

E-mail : petsir@kku1.kku.ac.th

ที่ปรึกษาโครงการวิจัย : ดร. พิสวรรณ เจียมสมบัติ (Dr. Pissawan Chiemsombat)

ตำแหน่ง : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 8

ที่ทำงาน : ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

โทรศัพท์ /โทรสาร: (034) 351890

E-mail : agrpwc@nontri.ku.ac.th

3. สาขาที่ทำการวิจัย : อนุชีววิทยาเกี่ยวกับการเกษตร

4. งบประมาณทั้งโครงการ : 400,000.- บาท (สี่แสนบาทถ้วน)

4. ระยะเวลาดำเนินงาน : 3 ปี

6. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดอาการใบด่าง เนื้อเยื่อตายแบบรุนแรงในถั่วลิสง ได้ถูกสำรวจพบครั้งแรก ที่จังหวัดอุบลราชธานีในปี พ.ศ. 2537 เนื่องจากมีความสัมพันธ์ทางเซรุ่มวิทยากับเชื้อไวรัสใบด่างขีดถั่วลิสง (peanut stripe virus, PSIV) ตั้งชื่อในเบื้องต้นว่า peanut stripe virus-severe necrotic strain (PSIV-SN) ทำให้เกิดอาการโรคที่รุนแรงมากกว่าเชื้อ PSIV-T6 ที่เคยมีรายงานมาก่อน เชื้อ PSIV-SN มีศักยภาพสูงมากที่จะเป็น PSIV สายพันธุ์ใหม่ที่มีความรุนแรงมากที่สุดในขณะนี้ และมีความแตกต่างจากเชื้อ PSIV ที่เคยมีรายงาน หรืออาจเป็นไวรัสชนิดใหม่ที่มีความใกล้เคียงกับ PSIV เป็นอย่างมาก เพื่อพิสูจน์สมมุติฐานนี้

การโคลนยีนไวรัสจึงเป็นสิ่งจำเป็น โดยเฉพาะในส่วนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถบ่งบอกความสัมพันธ์ในระดับชนิด (species) หรือระดับสายพันธุ์ (strain) ของไวรัสได้ ซึ่งกรณีนี้คือ *Potyvirus* ก็คือ ยีนโปรตีนห่อหุ้ม (coat protein gene) นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้รับอาจอธิบายถึงความแตกต่างในระดับความรุนแรงของอาการโรคได้ จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการโคลนยีนส่วน CP ของ PSIV-SN ก่อน และเพื่อเป็นการนำไปสู่การผลิตตัวลิสต์ต้านทานต่อเชื้อไวรัสสำคัญนี้ตามแนวทางของการสร้างความต้านทานโดยใช้ยีนของไวรัสเอง (pathogen-derived resistance, PDR) โครงการวิจัยนี้จึงเน้นการโคลนทั้งยีนโปรตีนห่อหุ้มและยีน replicase -ของเชื้อ PSIV-SN

7. วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 7.1 โคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มและยีน replicase ของเชื้อ PSIV-SN
- 7.2 ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มและยีน replicase
- 7.3 ริเริ่มงานวิจัยทางด้านอนุชีววิทยาของเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืช ณ ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ ม.ขอนแก่น

8. ระเบียบวิธีวิจัย

8.1 การเพิ่มปริมาณเชื้อและการเตรียมไวรัสบริสุทธิ์

เพิ่มปริมาณไวรัส PSIV-SN โดยการปลูกเชื้อโดยวิธีกลลงบนตัวลิสต์พันธุ์ไททาน 9 ที่ปลูกไว้ในสภาพเรือนทดลอง เก็บใบพืชที่แสดงอาการของโรคหลังปลูกเชื้อ 14-21 วัน นำมาแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70°C สำหรับนำมาแยกไวรัสบริสุทธิ์เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

8.2 การแยกสกัด และตรวจสอบคุณสมบัติบางประการของจีโนมไวรัส PSIV-SN

ก. แยกสกัด genomic RNA จากอนุภาคไวรัสบริสุทธิ์ โดยใช้ RNA extraction buffer 1 (200 mM ammonium carbonate, pH 9.0, 2 mM EDTA, 2% SDS, และ 0.1% proteinase K (100 mg/ml)) หรือ buffer 2 (2X SSC, 2 mM EDTA, 2% SDS, และ 0.1% Proteinase K (100 mg/ml)) ทำจัดส่วนโปรตีนโดย phenol-chloroform extraction และตกตะกอน RNA ด้วยเอทานอล ตรวจสอบคุณภาพของ RNA ที่ได้โดย agarose gel electrophoresis วัดขนาดโดยประมาณเมื่อเปรียบเทียบกับกรดนิวคลีอิกขนาดมาตรฐาน (DNA marker) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

ตรวจสอบชนิดของ genomic RNA ที่สกัดได้จากเชื้อ PSIV-SN โดยการทดสอบกับเอนไซม์ RNase A ในสภาพบัฟเฟอร์ 2X SSC และ 0.1X SSC แล้วแยกโดย agarose gel electrophoresis ตรวจสอบหลังการย้อมเจลด้วยอีทิเดียมโบรไมด์

ข. แยกสกัด total RNA จากใบพืชเป็นโรคด้วยการบดใบตัวลิสต์เป็นโรคใน buffer A (0.5 M potassium phosphate buffer, 0.5% sodium sulfite, pH8.3) ย้ายลงในหลอด microfuge ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที ตูดส่วนน้ำใสลงในหลอดใหม่ เติมน้ำล้าง buffer B (2% Triton X-100, 4% PEG, 0.1 M NaCl) จำนวน 1 ปริมาตร บ่มบนน้ำแข็งนาน 1 ชั่วโมง จึงปั่นเหวี่ยง ตูดส่วนของ

เหลวทิ้งไปให้มากที่สุดแล้วจึงละลายตะกอนด้วย TE buffer วิเคราะห์คุณภาพโดย agarose gel electrophoresis และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

8.3 การวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค PSIV-SN

สกัดโปรตีนจากเนื้อเยื่อใบถั่วลิสงจากต้นปกติและเป็นโรคแล้วแยกโมเลกุลด้วย SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ที่ความเข้มข้นของ resolving gels 8,10 และ 12% และมี 5 % stacking gel เปรียบเทียบกับโปรตีนจากอนุภาคไวรัสบริสุทธิ์ และ โปรตีนขนาดมาตรฐาน ย้อมแผ่นเจลด้วย Coomassie brilliant blue R-250 บันทึกภาพ คำนวณน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไวรัส

8.4 การโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มของ PSIV-SN

ก. ด้วยเทคนิค RT-PCR

สังเคราะห์ cDNA จาก RNA ต้นแบบที่สกัดจากอนุภาคของเชื้อ PSIV-SN โดยใช้ specific primers ที่จำเพาะกับ PSIV (PST- primers) ที่ออกแบบจากบริเวณที่ conserve ในยีน replicase และยีนโปรตีนห่อหุ้มของเชื้อ PSIV-blotch และ specific primers (CAMV-RV / CAMV-FW primers) ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มเชื้อ cowpea aphid borne mosaic (CAMV) สังเคราะห์ cDNA เส้นแรกโดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 42 ° ซ นาน 60 นาที

สังเคราะห์ และเพิ่มปริมาณ DNA เส้นคู่โดยปฏิกิริยา PCR มีโปรแกรมดังนี้ (1) denature ที่ 94 ° ซ นาน 2 นาที จำนวน 1 รอบ และ (2) 94 ° ซ นาน 30 วินาที , annealing ที่ 55 ° ซ นาน 45 วินาที และ primer extension ที่ 72 ° ซ นาน 90 วินาที ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ และ (3) final extension ที่ 72 ° ซ นาน 10 นาที

วิเคราะห์ขนาดของ cDNA เส้นคู่ที่ถูกเพิ่มปริมาณได้ด้วย gel electrophoresis เปรียบเทียบขนาด cDNA เส้นคู่ที่ได้รับกับดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน เลือกชิ้นส่วน cDNA ขนาดที่ตรงตามความคาดหวังแล้วเชื่อมต่อเข้ากับพาหะ pGEM-T (Promega) คัดเลือกโคลนโดย blue/white selection, การวิเคราะห์ขนาดพลัสמידหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และการใช้ DNA probe ที่จำเพาะกับส่วนยีนโปรตีนห่อหุ้ม คัดเลือกโคลนเพื่อเป็นตัวแทนสำหรับศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง Automated DNA sequencer วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม DNASIS (version3.7)

ข. โดยวิธีมาตรฐาน

แยกสกัด RNA ออกจากอนุภาคไวรัสบริสุทธิ์โดยวิธี phenol / chloroform extraction เพื่อใช้เป็นต้นแบบสังเคราะห์ first strand cDNA โดยปฏิกิริยาเอนไซม์ MMLV- reverse transcriptase ก่อน แล้วจึงสังเคราะห์ second strand cDNA โดยปฏิกิริยาเอนไซม์ *RnaseH* และ T4 DNA polymerase, คัดแปลงส่วนปลายโมเลกุลของ cDNA ให้เป็น blunt end ด้วยเอนไซม์ Klenow fragment ก่อนแล้วเติม *EcoRI* / *Not I* adaptor ทั้งสองข้างของโมเลกุล cDNA เชื่อมต่อเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ pUC118 ที่เตรียมไว้ ตรงตำแหน่ง *EcoRI* ส่งถ่ายดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์ *E.coli* JM109 โดยวิธี heat shock transformation คัดเลือก recombinant clones โดยใช้อาหาร LB ที่เติมแอมพิซิลิน, IPTG และ X-gal วิเคราะห์ขนาดของพลัสמידดีเอ็นเอหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และคัดเลือกโคลนที่มียีนโปรตีนห่อหุ้มด้วยเทคนิค nucleic acid hybridization โดยใช้ DNA probe ที่เตรียมได้จาก insert DNA ของโคลน pGEM-NC28 ตัดด้วยเอนไซม์

SphI และ *SalI* แยกเฉพาะส่วน insert cDNA ออกจากเจล (low melting agarose gel, Sea Plaque) และสกัดด้วย phenol / chloroform extraction อีกครั้ง ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethanol precipitation ติดฉลากโมเลกุลของดีเอ็นเอต้นแบบด้วยสารเคมี ตามวิธีการที่ระบุไว้ในคู่มือการใช้ ECLTM direct nucleic acid labeling and detection System (Amersham) ได้เป็น NC 28 probe สำหรับนำไปทำปฏิกิริยา hybridization กับ DNA จากโคลน pGEM-NC ต่างๆ ที่อุณหภูมิ 42 °ซ แล้วล้าง NC28 probe ส่วนเกินออกด้วย Wash buffer 1 (0.5 X SSC + 0.4% SDS) 2 x 10 นาที ที่ 55 °ซ และ Wash buffer 2 (2 x SSC) 2 x 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบการเกิดไฮบริดเชชันบนแผ่น nylon หลังจากเติมสารละลาย substrates โดยใช้แผ่นฟิล์มเอกซ์เรย์รับสัญญาณ

แยกสกัดดีเอ็นเอจากโคลนที่ให้สัญญาณไฮบริดเชชันกับ NC28 DNA probe ด้วยวิธี miniprep alkaline lysis ทำให้สะอาดด้วย phenol / chloroform extraction สำหรับนำมาเป็น DNA template ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ตามระบบ dideoxy chain termination โดยใช้ ALFexpressTM AutoCycleTM Sequencing Kit (Amersham) และเครื่องหาลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ ALFexpressTM (Pharmacia) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม DNASIS version 3.7

8.5 การโคลนยีน replicase ของ PSIV-SN ด้วยเทคนิค RT-PCR

สังเคราะห์ degenerated primers Potyvirus 1 (5' CAC GGA TCC CGG G(T)17 VGC 3'), Potyvirus 2 (5' ACC ACA GGA TCC GGB AAY AAY AGY GGD CAR CC 3') จำเพาะกับส่วนปลาย 3' ของจีโนมไวรัสในจีโนม Potyvirus, และ designed primers Nib-RV (5' GTA TGA TGT CAT CCC CAT TG 3'), Nib-FW (5' CAA CCC GAC AAA ATA GCT TG 3') ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PSIV-SN ที่ทราบแล้วจากการวิจัยนี้ และ PSIV-blotch ที่มีรายงานใน GenBank

สังเคราะห์ first strand cDNA จาก PSIV-SN RNA และ primer ที่กำหนดไว้ โดยอาศัยเอนไซม์ MMLV-reverse transcriptase ที่ 42 °ซ นาน 1.5 ชั่วโมง แล้วสังเคราะห์ cDNA สายคู่และเพิ่มปริมาณในเวลาเดียวกันโดย PCR มีโปรแกรมปฏิกิริยาสำหรับ Potyvirus primers คือ (1) อุณหภูมิ 94 °ซ 2 นาที จำนวน 1 รอบ; (2) อุณหภูมิ 94 °ซ 1 นาที, 60 °ซ 2 นาที และ 72 °ซ 3 นาที ทำซ้ำทั้งหมด 35 รอบ และ (3) อุณหภูมิ 72 °ซ 8 นาที จำนวน 1 รอบ และสำหรับ Nib primers คือ (1) อุณหภูมิ 94 °ซ 2 นาที จำนวน 1 รอบ; (2) อุณหภูมิ 94 °ซ 2 นาที, 55 °ซ 1 นาที และ 72 °ซ 2 นาที ทำซ้ำทั้งหมด 35 รอบ และ (3) อุณหภูมิ 72 °ซ 8 นาที จำนวน 1 รอบ

ตรวจสอบขนาดแถบดีเอ็นเอบน 2% agarose gel, 1 x TAE buffer เปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน แยกดีเอ็นเอ ขนาด 0.8 และ 1.7 kb จากปฏิกิริยา PCR เมื่อใช้ primer Potyvirus 1/Potyvirus-2, และขนาด 1.2 kb เมื่อใช้ primers Nib-RV/Nib-FW นำมาเชื่อมต่อเข้ากับพาหะ pGEM-T easy (Promega) โดยเอนไซม์ T4 DNA ligase ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 16 ชั่วโมง ส่งถ่ายโมเลกุลดีเอ็นเอสายผสมเข้าในเซลล์ของ *E. coli* JM 109 โดยใช้เครื่องมือ Gene Pulser (Bio Rad) คัดเลือกโคลนบนอาหาร LB ที่เติมแอมพิซิลิน IPTG และ X-gal เลือกเฉพาะโคโลนีสีขาวขึ้นมาวิเคราะห์ขนาดพลาสมิดหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ คัดเลือกโคลนตัวแทนสำหรับตรวจหาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์