



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มและยีน replicase ของเชื้อ peanut
stripe virus สายพันธุ์เนื้อเยื่อตายแบบรุนแรง
ในถั่วลิสง

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

ดร.เพชรรัตน์ สิริวงษ์ และ คณะ

ตุลาคม 2543

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. วังดา คิษฐพงษ์พิชญ์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ อนุเคราะห์เครื่องมือเครื่องใช้และสารเคมีที่จำเป็นบางอย่างในการทำวิจัย

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

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

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ได้ให้การสนับสนุนด้านสถานที่ ครุภัณฑ์และวัสดุอุปกรณ์ที่จำเป็นในการวิจัยบางอย่างจนสิ้นสุดโครงการ

ดร.เพชรรัตน์ ศิริวงศ์

ตุลาคม 2543

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : PDF/ 82 / 2540

ชื่อโครงการ : การโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มและยีน replicase ของเชื้อ peanut stripe virus สายพันธุ์
เนื้อเยื่อตายแบบรุนแรงในถั่วลิสง

นักวิจัยที่เกี่ยวข้อง : 1) ดร.เพชรรัตน์ ศิริวงศ์ (ผู้ดำเนินการวิจัย)

ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

2) ผศ.ดร.พิสสรณ เจียมสมบัติ (ที่ปรึกษาโครงการวิจัย)

ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

ระยะเวลาที่ทำการวิจัย : สิงหาคม 2540 - ตุลาคม 2543

วัตถุประสงค์ : โคลนยีนและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์โปรตีนห่อหุ้มและยีน replicase ของเชื้อ PSIV severe necrotic strain (PSIV-SN), วิเคราะห์งานวิจัยทางด้านอนุชีววิทยาของเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืช
ณ ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

วิธีการวิจัย : เพิ่มปริมาณเชื้อไวรัส PSIV-SN บนถั่วลิสงไททานิก 9 สังเกตอาการของโรคที่เกิดขึ้น
และเก็บใบที่เป็นโรคหลังจากปลูกเชื้อได้ 14-21 วันสำหรับนำไปแยกไวรัสบริสุทธิ์ ศึกษาคุณสมบัติ
ของกรดนิวคลีอิกของอนุภาคไวรัสโดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ ศึกษาชนิดและน้ำหนักโมเลกุลโปรตีน
ห่อหุ้มอนุภาคโดยวิธี SDS-PAGE โคลนยีนเป้าหมายด้วยเทคนิค cDNA cloning แบบมาตรฐาน
และ RT-PCR cloning โดยใช้ PSIV-SN RNA เป็นต้นแบบ ตรวจหาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอ
ไทด์ ด้วยโปรแกรม DNASIS version 3.7

ผลการวิจัย : เชื้อ PSIV-SN ทำให้เกิดอาการเนื้อเยื่อตายแบบรุนแรงในถั่วลิสง ใบร่วงและบิดเบี้ยว
ต้นแคระแกร็น จากใบถั่วลิสงเป็นโรค 100 กรัมแยกสกัดไวรัสบริสุทธิ์ได้ 8-9 มิลลิกรัม PSIV-SN มี
อนุภาคเป็นท่อนยาวคด จีโนมแบบ single strand RNA และโปรตีนห่อหุ้มมีน้ำหนักโมเลกุล 32
กิโลดาลตัน ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนปลาย 3' ของจีโนม PSIV-SN จำนวน 2,793 นิวคลีโอ
ไทด์(nt) ประกอบด้วยบางส่วนของยีน Nla (114 nt), ยีน replicase (1,548 nt), ยีนโปรตีนห่อหุ้ม
(861 nt), ส่วน 3' non-coding region (3'-NCR) (253 nt) และ poly A tail (17 nt)

สรุปสาระสำคัญของผลที่ได้จากการวิจัย : PSIV-SN มีคุณสมบัติเป็นไวรัสในวงศ์ Potyviridae
ยีนโปรตีนห่อหุ้มมีขนาด 861 nt และยีน replicase มีขนาด 1,548 nt จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์
และกรดอะมิโนของโปรตีนห่อหุ้ม และ 3'-NCR เชื้อ PSIV-SN จำแนกเป็น PSIV สายพันธุ์ใหม่

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต : การปรับปรุงพันธุ์ถั่วลิสงที่ปลูกเป็นการค้าในประเทศไทย
ให้ต้านทานต่อเชื้อ PSIV โดยการทำพันธุวิศวกรรมด้วยยีนโปรตีนห่อหุ้ม และ/หรือยีน replicase
จาก PSIV-SN

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

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 สิริวงศ์ (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. พิสสุวรรณ เขียมสมบัติ (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 เนื่องจากมีความสัมพันธ์ทางเซรุ่มวิทยากับเชื้อไวรัสใบด่างชนิดถั่วลิสง (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 โดยเฉพาะในส่วนที่สำคัญนิวคลีโอไทด์สามารถบ่งบอกความสัมพันธ์ในระดับชนิด (species) หรือระดับสายพันธุ์ (strain) ของไวรัสได้ ซึ่งกรณีนี้ไวรัส *Potyvirus* ก็คือ ยีนโปรตีนห่อหุ้ม (coat protein gene) นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้รับอาจอธิบายถึงความแตกต่างในระดับความรุนแรงของอาการโรคได้ จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการโคลนยีนส่วน CP ของ PSIV-SN ก่อน และเพื่อเป็นการนำไปสู่การผลิตตัวลิสงต้านทานต่อเชื้อไวรัสสำคัญนี้ตามแนวทางของการสร้างความต้านทานโดยใช้ยีนของไวรัสเอง (pathogen-derived resistance, PDR) โครงการวิจัยนี้จึงเน้นการโคลนทั้งยีนโปรตีนห่อหุ้มและยีน replicase -ของเชื้อ PSIV-SN

7. วัตถุประสงค์ของโครงการ

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

8. ระเบียบวิธีวิจัย

8.1 การเพิ่มปริมาณเชื้อและการเตรียมไวรัสบริสุทธิ์

เพิ่มปริมาณไวรัส PSIV-SN โดยการปลูกเชื้อโดยวิธีกลลงบนแก้วลิสงพันธุ์โทนาน 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 ตรวจสอบผลหลังการย่อยเจลด้วยอิกิเดียมไบรไมด์

ข. แยกสกัด total RNA จากใบพืชเป็นโรคด้วยการบดใบแก้วลิสงเป็นโรคใน buffer A (0.5 M potassium phosphate buffer, 0.5% sodium sulfite, pH8.3) บำยลงในหลอด microfuge บั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที ตูดส่วนน้ำใสลงในหลอดใหม่ เติมสารละลาย 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, การวิเคราะห์ขนาดพลาสมิดหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 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, ตัดปลายโมเลกุลของ cDNA ให้เป็น blunt end ด้วยเอนไซม์ Klenow fragment ก่อนแล้วเติม *EcoRI* / *NotI* 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 วิเคราะห์ขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ *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 จัดฉากโมเลกุลของดีเอ็นเอต้นแบบด้วยสารเคมี ตามวิธีการที่ระบุไว้ในคู่มือการใช้ ECL™ direct nucleic acid labeling and detection System (Amersham) ได้เป็น NC 28 probe สำหรับนำไปทำปฏิกิริยา hybridization กับ DNA จากโคลน pGEM-NC ต่างๆ ที่อุณหภูมิ 42 °C แล้วล้าง NC28 probe ส่วนเกินออกด้วย Wash buffer 1 (0.5 X SSC + 0.4% SDS) 2 x 10 นาที ที่ 55 °C 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 ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ตามระบบ dideoxy chain termination โดยใช้ ALFexpress™ AutoCycle™ Sequencing Kit (Amersham) และเครื่องหาลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ ALFexpress™ (Pharmacia) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม DNASIS version 3.7

8.5 การโคลนยีน replicase ของ PSIV-SN ด้วยเทคนิค RT-PCR

สังเคราะห์ degenerated primers Potyvirid 1 (5' CAC GGA TCC CGG G(T)17 VGC 3'), Potyvirid 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 °C นาน 1.5 ชั่วโมง แล้วสังเคราะห์ cDNA สายคู่และเพิ่มปริมาณในเวลาเดียวกันโดย PCR มีโปรแกรมปฏิกิริยาสำหรับ Potyvirid primers คือ (1) อุณหภูมิ 94 °C 2 นาที จำนวน 1 รอบ; (2) อุณหภูมิ 94 °C 1 นาที, 60 °C 2 นาที และ 72 °C 3 นาที ทำซ้ำทั้งหมด 35 รอบ และ (3) อุณหภูมิ 72 °C 8 นาที จำนวน 1 รอบ และสำหรับ Nib primers คือ (1) อุณหภูมิ 94 °C 2 นาที จำนวน 1 รอบ; (2) อุณหภูมิ 94 °C 2 นาที, 55 °C 1 นาที และ 72 °C 2 นาที ทำซ้ำทั้งหมด 35 รอบ และ (3) อุณหภูมิ 72 °C 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 Potyvirid 1/Potyvirid-2, และขนาด 1.2 kb เมื่อใช้ primers Nib-RV/Nib-FW นำมาเชื่อมต่อกับพาหะ pGEM-T easy (Promega) โดยเอนไซม์ T4 DNA ligase ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 16 ชั่วโมง ส่งถ่ายโมเลกุลดีเอ็นเอสายผสมเข้าในเซลล์ของ *E. coli* JM 109 โดยใช้เครื่องมือ Gene Pulser (Bio Rad) คัดเลือกโคลนบนอาหาร LB ที่เติมแอมพิ-ซิคลิน IPTG และ X-gal เลือกเฉพาะโคโลนีสีขาวขุนมาวิเคราะห์ขนาดพลาสมิดหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ คัดเลือกโคลนตัวแทนสำหรับตรวจหาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

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 สายพันธุ์อื่นและพืชไวรัสชนิดอื่น 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, การคัดเลือกกริคอม-บิแนนท์โคลน, การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม DNASIS(version 3.7)

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	
บทคัดย่อ	
Abstract	
Excutive Summary	i
สารบัญ	vi
สารบัญภาพ	a
สารบัญตาราง	d
เนื้อหาการวิจัย	
บทนำ	1
วิธีการและผลการทดลอง	
1. การเตรียมเชื้อ แยกเชื้อไวรัสบริสุทธิ์ การศึกษาคุณสมบัติของอนุภาค	
1.1 การเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัส	2
1.2 การแยกเชื้อไวรัสบริสุทธิ์	5
1.3 การศึกษา physico-chemical properties ของ PSIV-SN	8
2. การโคลนยีน	
2.1 การโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มของเชื้อ PSIV-SN	
ก. การโคลนยีนด้วยเทคนิค RT-PCR	12
ข. การโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มโดยวิธีมาตรฐาน	22
2.2 การโคลนยีน replicase ของเชื้อ PSIV-SN	31
ก. การใช้ degenerated primer	31
ข. การใช้ designed primers ที่จำเพาะกับยีน Nla/Nib	39
2.3 สรุปผลการโคลนยีนของเชื้อ PSIV-SN	44
3. การวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนกับไวรัสชนิดอื่น	48
ก. ยีน replicase หรือ viral replicase	48
ข. ยีนโปรตีนห่อหุ้ม	50
ค. ส่วน 3' non-coding region	54
สรุปผลการทดลองตลอดโครงการวิจัย	57
บทวิจารณ์	63
เอกสารอ้างอิง	65
Out put ที่ได้รับ	69
ภาคผนวก	70

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 อาการใบด่าง-เนื้อเยื่อตายแบบรุนแรงที่เกิดจากเชื้อ peanut stripe virus-severe necrotic strain บนถั่วลิสงพันธุ์ ไทนาน 9	4
ภาพที่ 2 ตัวอย่างขั้นตอนการแยกไวรัสบริสุทธิ์ของเชื้อ peanut stripe virus-severe necrotic strain	6
ภาพที่ 3 ลักษณะของอนุภาค peanut stripe virus-severe necrotic strain หลังจากสิ้นสุดขั้นตอนการแยกไวรัสบริสุทธิ์ ย้อมด้วย 2 % potassium phosphotungstic acid แล้วตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	7
ภาพที่ 4 รูปแบบของแถบโปรตีนจากใบถั่วลิสงปกติ (H) และ ใบถั่วลิสงเป็นโรคเนื่องจากเชื้อ peanut stripe virus-severe necrotic strain (D) และอนุภาคไวรัสบริสุทธิ์ (V) เมื่อแยกบนตัวกลางเจลที่มีความเข้มข้นต่างๆ 3 ระดับ (8, 10 และ 12% gel)	10
ภาพที่ 5 RNA ที่แยกสกัดได้จากอนุภาคเชื้อ peanut stripe virus-severe necrotic strain โดยวิธี phenol/chloroform extraction แล้ววิเคราะห์ขนาดโดย 1 % agarose gel electrophoresis	11
ภาพที่ 6 แสดงโครงสร้างของจีโนมไฟโตไวรัส ตำแหน่งและทิศทางของ specific primers สำหรับโคลนยีนเชื้อ PSIV-severe necrotic strain โดยเทคนิค RT-PCR	15
ภาพที่ 7 RT-PCR product ที่ได้จากการกรตนิวคลีโอไทด์จากใบถั่วลิสงเป็นโรคจากเชื้อ peanut stripe virus-severe necrotic strain เป็นต้นแบบ ร่วมกับ primers ชนิดต่างๆ ตรวจแยกขนาดบน 1.5 % agarose gel	17
ภาพที่ 8 Plasmid map ของ pGEM-T และ pGEM-T easy cloning vectors	18
ภาพที่ 9 รูปแบบของดีเอ็นเอจากโคลน pGEM-NC ต่างๆหลังจากการตัดด้วย เอนไซม์ BstZI	19
ภาพที่ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ที่สังเคราะห์จาก RNA ของเชื้อ PSIV-SN เป็นต้นแบบจำนวน 665 นิวคลีโอไทด์จากโคลน pGEM-NC28 และ pGEM- NC67	20
ภาพที่ 11 การ alignment ของลำดับกรดอะมิโน 221 เรสิดิวส์ จาก inserted cDNA ขนาด 665 นิวคลีโอไทด์ของเชื้อ peanut stripe virus-severe necrotic strain เปรียบเทียบกับยีนโปรตีนห่อหุ้มของเชื้อ PSIV blotch และ PSIV-T6/97	21

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 12 ขั้นตอนการโคลนยีนของเชื้อ peanut stripe virus-severe necrotic strain ตามวิธีมาตรฐานของ Gubler and Hoffman (1983) โดยใช้ RNA จากอนุภาคไวรัสบริสุทธิ์เป็นต้นแบบ และ cDNA synthesis kit (Pharmacia) และ pUC118 vector	24
ภาพที่ 13 Plasmid map ของพลาสมิด pUC118/119	25
ภาพที่ 14 ขนาดของ insert DNA จากโคลน pUCNC หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ <i>EcoRI</i> แล้ววิเคราะห์บน 1 % agarose gel electrophoresis	27
ภาพที่ 15 การคัดเลือกโคลน pUCNC ที่มียีนโปรตีนห่อหุ้มของเชื้อ peanut stripe virus-severe necrotic strain โดยเทคนิค southern blot hybridization	28
ภาพที่ 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA สังเคราะห์จาก RNA ของเชื้อ PSIV-SN จำนวน 1,176 นิวคลีโอไทด์ (GenBank, accession number AF191748) และลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสแสดงไว้ในบรรทัดล่างต่อจากลำดับนิวคลีโอไทด์	30
ภาพที่ 17 แสดงขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RT-PCR โดยใช้ Potyvirus1 /Potyvirus2 primers และ template RNA จากแหล่งต่างๆ สำหรับสังเคราะห์ first strand cDNA แยกบน 2 % agarose gel, 1X TAE buffer	34
ภาพที่ 18 แสดงโคลน pGTEN ต่างๆ ที่ได้จากการนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 0.8 -1.7 kb เข้าไปในพาหะ pGEM-T easy (Promega)	35
ภาพที่ 19 โคลน pGTEN ต่างๆ ที่ได้รับจากการนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 0.8 - 1.7 kb เข้าไปในพาหะ pGEM-T easy (Promega) เมื่อคัดเลือกโดยวิธีการต่างๆ	36
ภาพที่ 20 ลำดับนิวคลีโอไทด์(cDNA) ทางด้านปลาย 3'- terminal ของจีโนมของเชื้อ peanut stripe virus-severe necrotic strain 1,765 นิวคลีโอไทด์ (GenBank accession number AF 200632)	38
ภาพที่ 21 การโคลนยีน replicase ของเชื้อ PSIV-SN โดยใช้ Nib-RV และ Nib-FW primers และ RNA ของเชื้อ PSIV-SN เป็นต้นแบบ	42
ภาพที่ 22 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA จากโคลน SN-Nib#2 และ SN-Nib#3 จำนวน 1,177 นิวคลีโอไทด์	43
ภาพที่ 23 แผนภาพทิศทางการโคลนยีน และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน replicase และยีนโปรตีนห่อหุ้มเชื้อ peanut stripe virus-severe necrotic strain	45

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 24 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA จากจีโนมด้าน 3'-terminalของเชื้อ PSIV-SN และลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์จาก ORF 1 แสดงไว้ในบรรทัดล่างต่อจากลำดับนิวคลีโอไทด์	46-47
ภาพที่ 25 Phylogenetic tree ของลำดับกรดอะมิโนของ Nib protein (replicase) ระหว่างเชื้อ PSIV-SN กับ PSIV-blotch และ potyviruses ชนิดอื่นๆ วิเคราะห์โดยวิธี UPMGAของโปรแกรม DNASIS(version 3.7)	49
ภาพที่ 26 Phylogenetic tree ของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนห่อหุ้มจากเชื้อ PSIV-SN เปรียบเทียบกับ PSIV สายพันธุ์อื่นๆ และ potyviruses ชนิดอื่นๆ	52
ภาพที่ 27 Maximum matching ของลำดับกรดอะมิโนจากโปรตีนห่อหุ้มของเชื้อ PSIV-SN เปรียบเทียบกับ PSIV-T6/97 โดยโปรแกรม DNASIS(version 3.7)	53
ภาพที่ 28 Phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 3' non-coding region ของ เชื้อ PSIV-SN กับ PSIV-strains และ potyviruses อื่นๆ (ตารางที่ 3) เมื่อวิเคราะห์โดยโปรแกรม DNASIS	56

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 รายชื่อไวรัสและ accession number ที่นำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Nib (replicase) มาเปรียบเทียบกัน	48
ตารางที่ 2 ชนิดของไวรัสที่นำมาเปรียบเทียบกับเชื้อ PSIV-SN ในด้านความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนห่อหุ้ม	51
ตารางที่ 3 ชนิดไวรัสและ accession number ที่นำมาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน 3' non-coding region	55
ตารางที่ 4 วิธีการและเทคนิคที่เกี่ยวข้อง ที่ได้รับจากโครงการวิจัย	58

การโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มและยีน replicase ของเชื้อ peanut stripe virus
สายพันธุ์เนื้อเยื่อตายแบบรุนแรง ในถั่วลิสง
(cDNA cloning of coat protein and replicase genes of
peanut stripe virus-severe necrotic strain in peanut)

บทนำ

เชื้อ peanut stripe virus (PSIV) เป็นสาเหตุโรคที่สำคัญมากในการผลิตถั่วลิสง มีความหลากหลายในสายพันธุ์ของเชื้อ ความรุนแรงของความเสียหายที่เกิดขึ้นต่อผลผลิตถั่วลิสงขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส โดยสายพันธุ์ไวรัสที่แสดงอาการเนื้อเยื่อตาย (necrosis) ส่งผลกระทบต่อผลผลิตมากกว่าสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดอาการด่างจ้ำ (ไลกอนและสุมิตรา, 2532) จากการทดสอบหาพันธุ์ถั่วลิสงต้านทานต่อเชื้อ PSIV ของ ICRISAT จำนวน 11,000 สายพันธุ์ ยังไม่พบสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อเชื้อไวรัสนี้ (Higgins *et al.*, 1996) ในปัจจุบัน การปรับปรุงพันธุ์ถั่วลิสงต้านทานต่อโรคนี้จึงมุ่งเน้นในด้านการใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรม เพื่อส่งถ่ายจีโนมบางส่วนของไวรัสดังกล่าวเข้าไปในพืช เป็นการชักนำให้เกิดการต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อตามหลักการ pathogen - derived resistance (PDR) ดังที่ประสบผลสำเร็จครั้งแรกในปีค.ศ. 1986 ได้ต้นยาสูบถ่ายยีน (transgenic tobacco) ที่มีการแสดงออกของยีนโปรตีนห่อหุ้มของเชื้อ tobacco mosaic virus (TMV) ทำให้ต้นยาสูบดังกล่าวนี้มีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อ TMV (Powell-Abel *et al.*, 1986)

แนวทางของ PDR สามารถกระทำได้หลายวิธี และประสบผลสำเร็จแล้วทั้งการใช้ยีนโปรตีนห่อหุ้มไวรัส (coat protein-mediated protection) การใช้ยีน viral replicase (viral protease-mediated protection) การใช้ไรโบไซม์ (ribozyme-mediated protection) และการใช้แอนติบอดี (antibody-mediated protection) (Shukla *et al.*, 1994) สำหรับการป้องกันเชื้อไวรัสในจีนัส *Potyvirus* ที่ประสบผลสำเร็จมากคือ การใช้ยีนโปรตีนห่อหุ้ม เช่นรายงานของ Lawson *et al.* (1990) และการใช้ยีน replicase (Carr and Zaitlin, 1993; Verdi *et al.*, 1993)

ในประเทศไทยมีรายงานสายพันธุ์ของ PSIV โดยแบ่งตามลักษณะอาการของโรคที่จำเพาะกับพืชอาศัยได้ จำนวน 8 สายพันธุ์ (Wongkaew and Dollet, 1990) ต่อมาในปี พ.ศ. 2537 ดร. ไสภณ วงศ์แก้ว ได้พบโรคใบด่างถั่วลิสงชนิดที่ทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อใบถั่วลิสงอย่างรุนแรงมาก จากแปลงปลูกถั่วลิสงในจังหวัดอุบลราชธานี และได้เก็บรักษาเชื้อไว้ที่ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น การศึกษาเบื้องต้นพบว่าเชื้อไวรัสนี้มีความสัมพันธ์ทางเซรุ่มวิทยากับเชื้อ PSIV จึงได้ตั้งชื่อเป็น peanut stripe virus-severe necrotic strain (PSIV-SN)

เชื้อ PSIV-SN ทำให้ถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 แสดงอาการเนื้อเยื่อตายอย่างรุนแรง (severe necrosis) ทั้งบนส่วนใบ ก้านใบ หูใบและลำต้น ใบยอด มีอาการด่างเป็นวง (ring spot) และมีเนื้อเยื่อใบตายบางส่วน ทำให้ใบบิดเบี้ยว ใบมีขนาดเล็กลง ต้นแคระแกร็น ถ้าไวรัสเข้าทำลายในระยะ 10-14 วันหลังงอกจะทำให้ต้นเหี่ยวตายได้ มีความแตกต่างจากอาการที่เกิดขึ้นเนื่องจากเชื้อ PSIV-T6 ที่จัดเป็นสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดอาการเนื้อเยื่อตายบนถั่วลิสงเช่นเดียวกันแต่อาการโรคมีความรุนแรงน้อยกว่า อาการบนส่วนใบยอดพบเพียงอาการด่างจ้ำหรือด่างแถบ (blotch-stripe) (Wongkaew and Dollet, 1992) จึงอาจเป็นไปได้ว่า PSIV-SN เป็นเชื้อ PSIV สายพันธุ์ที่รุนแรงที่สุด และแตกต่างจากเชื้อ PSIV สายพันธุ์ต่างๆ ที่เคยมีรายงานมาก่อน

เพื่อพิสูจน์สมมุติฐานนี้ การศึกษาข้อมูลของจีโนมไวรัสจึงเป็นสิ่งจำเป็น โดยเฉพาะในส่วนของยีนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถบ่งบอกความสัมพันธ์ในระดับชนิด (species) หรือระดับสายพันธุ์ (strain) ของไวรัสได้ ซึ่งกรณีนี้คือ *Potyvirus* ส่วนที่สำคัญคือ ยีนโปรตีนห่อหุ้ม (coat protein gene) (Shukla and Ward, 1988, 1989) ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนนี้อาจใช้อธิบายถึงความแตกต่างในระดับความรุนแรงของอาการโรคที่ปรากฏบนพืชอาศัย และเพื่อเป็นการนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาไปใช้ประโยชน์สำหรับการผลิตถั่วลิสงต้านทานต่อเชื้อ PSIV ตามแนวทางของ PDR ในระยะต่อไป โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มและยีน replicase ของเชื้อ PSIV-SN และศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าว นอกเหนือจากการได้ริเริ่มงานวิจัยทางด้านอนุชีววิทยาของเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืช ณ ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ ม.ขอนแก่น

วิธีการและผลการทดลอง

การวิจัยตลอดโครงการได้แบ่งออกเป็นสามส่วน คือ (1) การเตรียมอนุภาคไวรัสบริสุทธิ์เพื่อนำไปศึกษาคุณสมบัติของอนุภาคทางด้านชีววิทยาและ ฟิสิกส์-เคมี และใช้เป็น material เริ่มต้นของส่วนการโคลนยีนเป้าหมาย (2) การโคลนยีน และ (3) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

1.1 การเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัส

วิธีการทดลอง

เชื้อไวรัสที่นำมาศึกษาคือ peanut stripe virus สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดอาการเนื้อเยื่อตายแบบรุนแรง (PSIV-SN) ซึ่งได้จากแปลงถั่วลิสงในจังหวัดอุบลราชธานีใน พ.ศ. 2537 และเก็บรักษาไว้ในสภาพใบแห้งในตู้เย็น นำตัวอย่างใบพืชเป็นโรคมานับใน 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 นำไปทาบบนใบถั่วลิสงอายุ 10-14 วันที่มีการโรยผงคาร์โบรันดัม (600 เมช) ไว้ก่อนแล้ว นำต้นพืชไปเก็บไว้ในเรือนทดลองที่ป้องกันแมลงได้ แล้วสังเกตอาการของโรค เมื่อมีจุดเนื้อเยื่อตาย (necrotic spot)

เกิดขึ้น แยกเฉพาะส่วนเนื้อเยื่อตายนี้ออกมาแล้วนำไปปลูกเชื้อกลับลงบนต้นถั่วลิสงอีกครั้งหนึ่ง เก็บตัวอย่างใบที่แสดงอาการของโรค ไว้เพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป

การเพิ่มปริมาณไวรัสเพื่อเตรียมไว้สำหรับการแยกไวรัสบริสุทธิ์นั้น ทำโดยการทาน้ำคั้นพืชเป็นโรคลงบนต้นถั่วลิสงอายุ 14 วันหลังงอก สังเกตอาการโรคและเก็บใบที่แสดงอาการโรคอย่างชัดเจน หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 14 และ 21 วัน และเก็บใบถั่วลิสงแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -80°C .

การแยกไวรัสบริสุทธิ์ออกจากใบถั่วลิสงเป็นโรค ใช้วิธีการของ Hammond and Lawson (1988) และ Sinwong *et al.* (1985) นำไวรัสบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ไปย้อมแบบ negative staining ด้วย 2% potassium phosphotungstic acid แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ผลการทดลอง

เชื้อ PSIV-SN สามารถถ่ายทอดไปยังพืชอาศัยได้ง่ายโดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีกล (mechanical inoculation) พืชอาศัยที่เหมาะสมคือถั่วลิสงและถั่วพุ่ม (*cowpea, Phaseolus vulgaris* L.) ในการวิจัยครั้งนี้ได้เลือกถั่วลิสงพันธุ์โพนาน 9 ซึ่งอ่อนแอต่อเชื้อนี้เป็นอย่างมาก มาเป็นพืชเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสในขั้นตอนการแยกไวรัสบริสุทธิ์ถึงแม้ว่าถั่วพุ่มจะให้ปริมาณใบต่อต้นมากกว่าถั่วลิสงก็ตาม ทั้งนี้เพื่อลดโอกาสการเกิดความผันแปรในส่วนจีโนมไวรัสที่อาจเกิดขึ้นได้จากการเปลี่ยนชนิดพืชอาศัย

อาการเฉพาะของโรคที่ชักนำให้เกิดขึ้นโดยเชื้อ PSIV-SN มีความรุนแรงแตกต่างกันบ้างเล็กน้อยขึ้นอยู่กับอายุของต้นถั่วลิสง กล่าวคือ ในระยะต้นกล้าอายุ 7-10 วันหลังงอก มักพบอาการเนื้อเยื่อตายแบบรุนแรง ทำให้ต้นเหี่ยวตายได้ ในต้นที่มีอายุมากขึ้นแล้วส่วนใบที่ได้รับการปลูกเชื้อพบอาการเนื้อเยื่อตาย (necrosis) อย่างรวดเร็วภายใน 5-7 วันหลังจากได้รับเชื้อเริ่มแรก ด้านหลังใบปรากฏการยุบตัวของเนื้อเยื่อและมีสีน้ำตาล บนใบอ่อนที่เจริญมาภายหลังการติดเชื้อแล้วมีอาการเป็นจุดหรือวงสีเหลืองซีด ต่อมามีอาการพองไม่ชัดเจน (mottle) และ เนื้อเยื่อตายเป็นจุดๆ ทำให้ใบบิดเบี้ยว (distortion) มีขนาดเล็กลง อาการเนื้อเยื่อตายสามารถสังเกตได้อย่างชัดเจนทั้งในบริเวณก้านใบ ลำต้น และหุบใบ เมื่อพิจารณาในภาพรวมแล้วต้นเป็นโรคมีอาการเฉื่อยแฉะ แตกแขนงน้อย (ภาพที่ 1)

ชนิดของบัฟเฟอร์ที่ใช้เตรียมน้ำคั้นพืชเพื่อปลูกเชื้อ คือ 0.1 M potassium phosphate, pH 7.0 ที่เติม 0.1 % (v/v) 2-mercaptoethanol ในอัตราส่วน 10 มล. ต่อ ใบพืชสด 1 กรัมและใช้ผงคาร์โบรันคัมขนาด 600 เมช สำหรับทำให้เกิดบาดแผล โดยโรยบนใบพืชก่อนทาน้ำคั้นพืชเป็นโรค



ภาพที่ 1 อาการที่เกิดจากเชื้อ peanut stripe virus-severe necrotic strain บนต้นถั่วลิสง พันธุ์ ไทนาน 9

- ก. ใบล่าง มีส่วนเนื้อเยื่อสีเหลือง-น้ำตาล เป็นแถบ หรือ เป็นวง (ring spot) ขนาดเล็ก ใบบิดเบี้ยวและมีขนาดเล็กลงกว่าใบปกติ
- ข. เนื้อเยื่อตายสีน้ำตาลปรากฏชัดเจนบนส่วนหลังใบ ก้านใบ และลำต้น ใบเริ่มเหี่ยวหลังจากปลูกเชื้อได้ 10-14 วัน

1.2 การแยกไวรัสบริสุทธิ์

การแยกไวรัสบริสุทธิ์จากใบถั่วลิสงไม่ประสบความสำเร็จเมื่อใช้วิธีการของ Hammond and Lawson (1988) ซึ่งพัฒนาไว้สำหรับแยกเชื้อ PSIV-blotch strain ออกจากใบยาสูบ *Nicotiana benthamiana* เนื่องจากได้ปริมาณไวรัสบริสุทธิ์น้อยมาก ไม่ถึง 1 มก. จากใบถั่วลิสง 100 กรัม ส่วนวิธีการของ Siri Wong et al. (1995) สามารถแยกเชื้อ PSIV-SN บริสุทธิ์ ได้จำนวน 5 - 8 มก. จากใบถั่วลิสงเป็นโรค 100 กรัม โดยมีขั้นตอนการแยกไวรัสบริสุทธิ์ ดังนี้

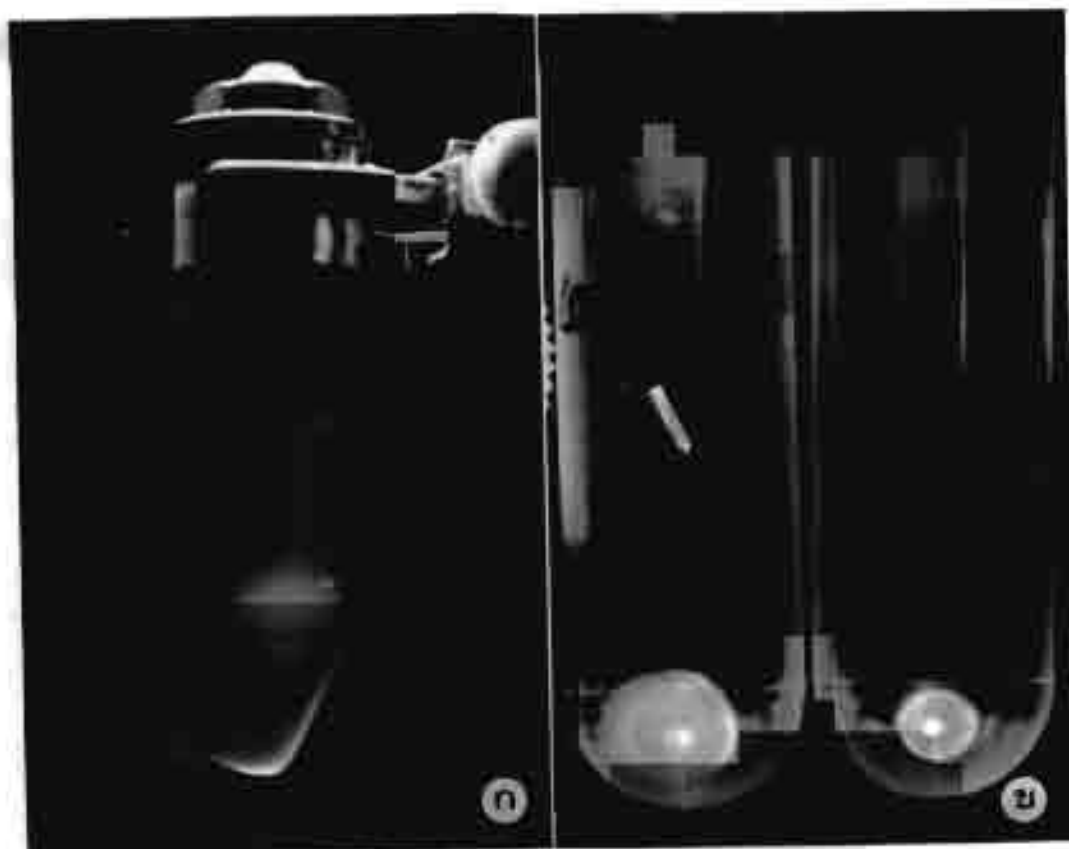
ใช้ใบถั่วลิสงเป็นโรคซึ่งแช่แข็งไว้ที่ -80°C ใช้ใบพืช 100 กรัม และ ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ประมาณ 4°C ในทุกขั้นตอน เริ่มจาก บดใบพืชให้ละเอียดโดยใช้เครื่องปั่นน้ำผลไม้ โดยเติมบัฟเฟอร์สกัด คือ 0.5 M potassium phosphate, pH 7.7 ที่เติม 0.02 M sodium sulfite และ 1% 2-mercaptoethanol (v/v) เติมน้ำบัฟเฟอร์ในอัตรา 3 มล. ต่อ ใบพืช 1 กรัม กรองน้ำคั้นพืชผ่านผ้าขาวบาง 3 ชั้น แล้วเติม chloroform อัตรา 10 % (v/v) กวนตลอดเวลาคด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ $8,000 \times g$ นาน 20 นาที ที่ 4°C แยกเก็บเฉพาะน้ำใสใสลงในเบ็กเกอร์ขนาด 1 ลิตร เติมน้ำ 0.1 M NaCl และ 8% PEG (6000) กวนเบาๆ ตลอดเวลา นาน 2 ชั่วโมง จึงปั่นเหวี่ยงที่ $10,000 \times g$ นาน 30 นาที เก็บเฉพาะตะกอน แล้วละลายตะกอนใน 0.5 M potassium phosphate buffer, pH 7.7 ที่เติม 1 mM EDTA อัตรา 1/10 ของปริมาตรน้ำคั้นพืชเริ่มแรก กวนเบาๆ ข้ามคืน

นำสารแขวนลอยไวรัสมาแยกส่วนประกอบของเซลล์พืชออก โดยใส่ในหลอดหมุนเหวี่ยงที่มี 10 มล. ของ 40% sucrose cushion ที่ละลายใน 0.05 M KPB, pH 7.7 + 1 mM EDTA ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 32,000 รอบ/นาที (Beckman, 70 Ti Rotor) 4°C นาน 1 ชั่วโมง ไวรัสอยู่ในชั้นของบัฟเฟอร์เหนือชั้นของสารละลายน้ำตาลที่เป็น cushion แยกเก็บส่วนที่มีไวรัสแขวนลอยอยู่

เติมน้ำบัฟเฟอร์ 0.25 M KPB, pH 7.5 ลงไปในหลอดในปริมาณเท่ากับปริมาตรของสารแขวนลอยไวรัส แล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 35,000 รอบ / นาที นาน 1.5 ชั่วโมง ได้ตะกอนของไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ (partial purified virus) อยู่ก้นหลอด (ภาพที่ 2) ละลายตะกอนนี้ด้วย 1 -1.5 มล. ของ 0.05 M KPB, pH 7.7

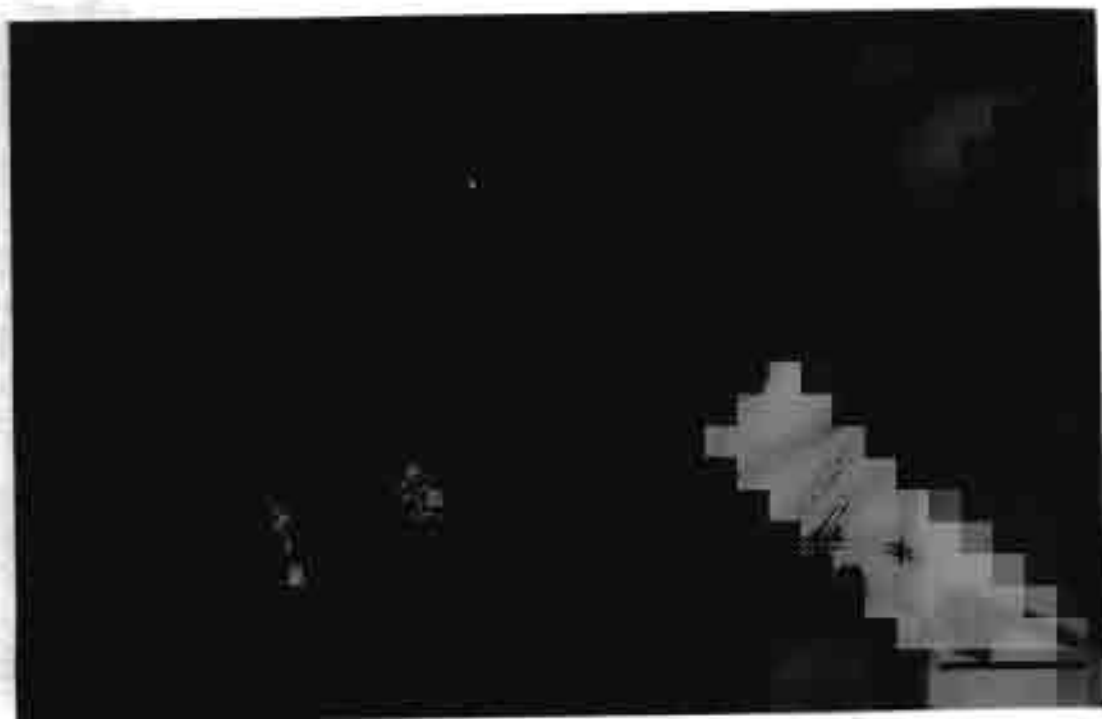
ทำให้ได้อนุภาคไวรัสที่บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นโดยใช้ sucrose density gradient centrifugation (น้ำตาลซูโครส 10 - 40 % ในบัฟเฟอร์ 0.05 M KPB, pH 7.7 ที่เติม 1 mM EDTA) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 23,000 รอบ/นาที (Beckman, SW 28 Ti Rotor) นาน 3 ชั่วโมง ตรวจดูแถบขาวขุ่นของอนุภาคไวรัสในหลอดปั่นโดยส่องได้หลอดไฟ ใช้ pasture pipette ดูเฉพาะแถบของไวรัสมาเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ 0.05 M KPB, pH 7.7 ที่เติม 1 mM EDTA ปริมาณเล็กน้อย 3 เท่าของปริมาตรสารแขวนลอยไวรัสที่ดูมา ปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนไวรัสอีกครั้งที่ความเร็ว 35,000 รอบ/นาที (Beckman, 70 Ti Rotor) นาน 1.5 ชั่วโมง ได้เป็นตะกอนหนืดสีขาวใสของอนุภาคไวรัส ละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ 0.01 M KPB, pH 7.0 จำนวน 0.5 -1 มล. เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80°C

เมื่อตรวจดูอนุภาคไวรัสบริสุทธิ์ที่แยกได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าประกอบด้วยอนุภาครูปร่างท่อนยาวคดเป็นส่วนใหญ่ โดยมีอนุภาคนาฬิกาลูกตุ้มปะปนอยู่จำนวนหนึ่ง (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 2 ตัวอย่างขั้นตอนการแยกไวรัสบริสุทธิ์ของเชื้อ peanut stipe virus-severe necrotic strain

- ก. ลักษณะของแถบชั้นขาวของชั้นบัฟเฟอร์ที่มีไวรัสแขวนลอยอยู่หลังจากขั้นตอน 40% sucrose cushion centrifugation
- ข. ตะกอนอนุภาคไวรัสก่อนข้างบริสุทธิ์จากส่วนของบัฟเฟอร์ในข้อ ก. เมื่อนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 35,000 รอบ/ นาที (Beckman 70 Ti rotor) นาน 1.5 ชั่วโมง



ภาพที่ 3 ลักษณะของอนุภาค peanut stripe virus-severe necrotic strain หลังจากสิ้นสุดขั้นตอนการแยกไวรัสบริสุทธิ์ ย้อมด้วย 2 % potassium phosphotungstic acid แล้วตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (bar = 200 นาโนเมตร)

1.3 การศึกษา physico-chemical properties ของ PSIV-SN

วิธีทดลอง

ก. ขนาดของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส

แยกสกัดโปรตีนทั้งหมด (total proteins) จากใบถั่วลิสงปกติและเป็นโรคจากเชื้อ PSIV-SN ตามวิธีการที่ระบุไว้โดย Siriwong *et al.* (1995) ดังนี้ ใช้ใบถั่วลิสง 0.5 กรัม บดใน 4 มล. บัฟเฟอร์สกัด [80 % (v/v) TE-saturated phenol , 0.001% (v/v) 2-mercaptoethanol ใน 120 mM Tris-HCl, pH 6.8 , 50 mM EDTA , 100 mM KCl] แล้วย้ายใส่ลงในหลอด Falcon ขนาด 10 มล.ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,000 รอบ/นาที (swinging bucket rotor , TOMY low speed centrifuge) นาน 10 นาที สูดส่วน phenol และ aqueous phase ใส่ลงในหลอดใหม่ (30 มล. Corex tube) ตกตะกอนโปรตีนด้วยการเติมสารละลาย 100 mM ammonium acetate ใน methanol ที่มี 1% mercaptoethanol ปริมาตร 5 เท่าของสารละลายในหลอด ปั่นที่ -20°C นานอย่างน้อย 1 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนโปรตีนที่ 8,000 x g นาน 20 นาที ล้างตะกอนด้วยสารละลายอะซิโตนที่มี 1%(v/v) mercaptoethanol ทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนด้วย protein sample buffer (63 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 5% mercaptoethanol , 20 % glycerol) ปริมาตร 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะใช้

วิเคราะห์ขนาดโปรตีนทั้งหมด (total proteins) จากตัวอย่างพืชเป็นโรค พืชปกติ เปรียบเทียบกับโปรตีนจาก อนุภาคไวรัสบริสุทธิ์ และโปรตีนมาตรฐาน(Pharmacia) โดยแยกบน discontinuous SDS-polyacrylamide gels เข้มข้น 8, 10, และ 12 % resolving gels รวม 3 ระดับตามวิธีการของ Sambrook *et al.* (1989) ย้อมเจลดด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250

ข. คุณสมบัติของกรดนิวคลีอิก

แยกสกัดกรดนิวคลีอิกออกจากอนุภาคไวรัสบริสุทธิ์ตามวิธี phenol / chloroform extraction ของ Siriwong (1995) โดยใช้ extraction buffer คือ 0.05 M Tris-HCl, pH 8.5- 9.0 , 2% SDS, 1 mg/ml proteinase K ในอัตราสารแขวนลอยไวรัสบริสุทธิ์คือ extraction buffer เท่ากับ 1: 3 (v/v) ปั่นที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง แล้วเติม TE-saturated phenol : chloroform (1:1, v/v) ในอัตรา 1:1 ผสมให้เข้ากันเบาๆโดยการพลิกหลอดที่บรรจุไปมาประมาณ 5 นาที ปั่นเหวี่ยงในเครื่อง microcentrifuge นาน 5 นาที สูดมาเฉพาะส่วน aqueous phase ใส่ลงในหลอดใหม่ แล้วแยกสกัดด้วย phenol / chloroform ซ้ำอีกจนไม่พบชั้นของโปรตีนระหว่าง aqueous phase และ phenol phase จึงตกตะกอนกรดนิวคลีอิกจาก aqueous phase โดยเติม 0.1 ปริมาตรของ 3 M sodium acetate, pH 5.4 และ 2.5 ปริมาตรของ ethanol ปั่นที่ -80°C นาน 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 25 นาที ล้าง

ตะกอนด้วย 70% ethanol ทำให้ตะกอนแห้งแล้วละลายใน TE buffer, pH 8.0 วัดความเข้มข้นของกรดนิวคลีอิกด้วยเครื่อง spectrophotometer

ตรวจสอบคุณภาพและขนาดของกรดนิวคลีอิกจากอนุภาคไวรัสบน 1-1.5 % agarose gel โดยใช้ 1 X TAE buffer และ λ DNA/Hind III markers

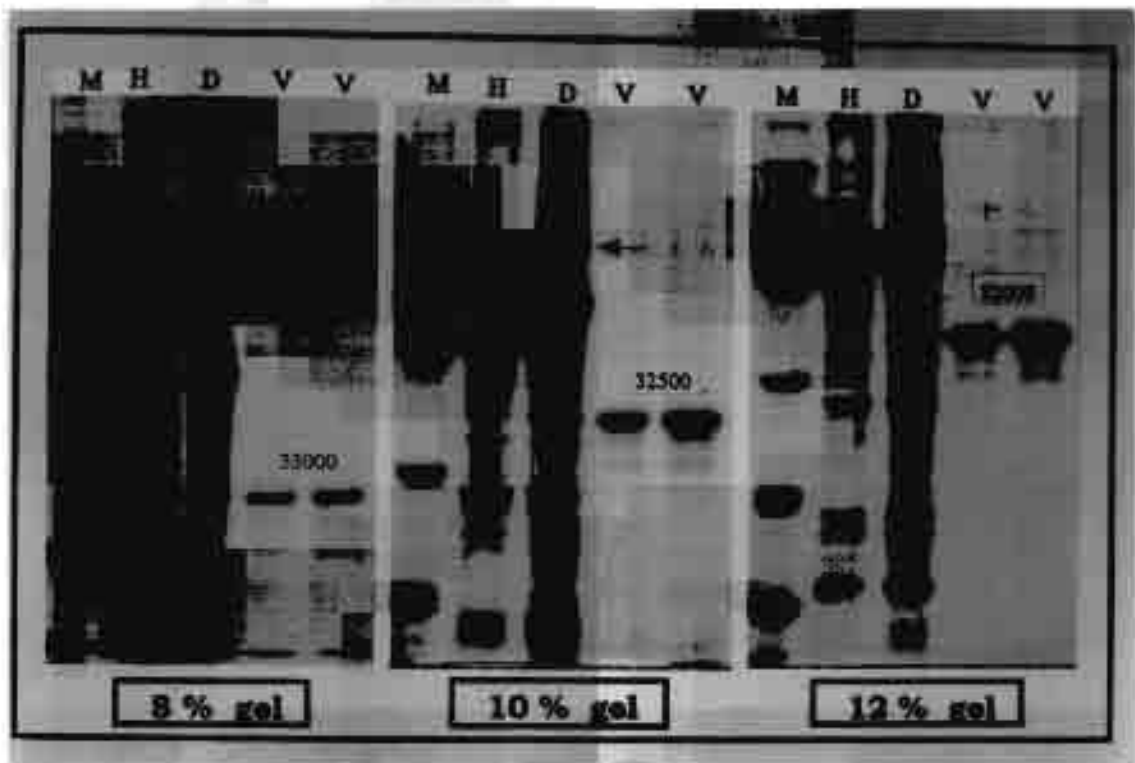
ตรวจสอบชนิดของกรดนิวคลีอิกของอนุภาคไวรัสโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ *RNase A* (0.1 μ g/ml) และ *DNase I* (50 Units / ml) ในบัฟเฟอร์ 0.1 x SSC และ 2 X SSC ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง (Siriwong *et al.*, 1995) วิเคราะห์ผลด้วย 1% agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับกรดนิวคลีอิกในสภาพปกติ และ λ DNA / Hind III markers

ผลการทดลอง

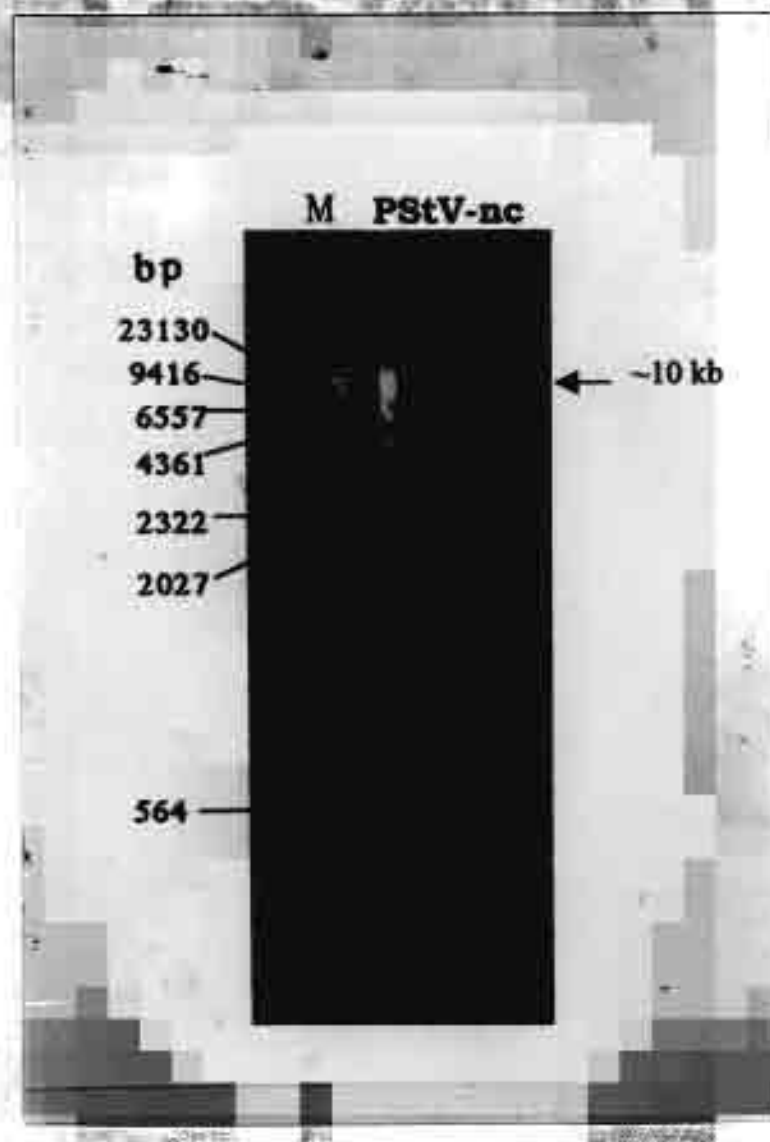
เชื้อ PSIV-SN มีโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคที่ประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อย (protein subunit) เพียงชนิดเดียว มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 32,000-33,000 ดาลตัน เมื่อคำนวณจากกระบวนทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนบนเจลที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 3 ระดับ ตรงกันกับตำแหน่งของแถบโปรตีนที่สกัดได้จากพืชเป็นโรคโดยไม่พบในโปรตีนที่สกัดจากใบพืชปกติ และตรวจพบแถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 70,000 ดาลตันเด่นชัดมากในตัวอย่างใบพืชเป็นโรค (ภาพที่ 4) คาดว่าเป็น virus-related proteins ซึ่งตรงกับที่มีรายงานโปรตีนที่ชักนำให้สร้างขึ้นโดยเชื้อไวรัสในจีนัส *Potyvirus* คือ cylindrical inclusion protein (CI) (Atreya, 1992)

กรดนิวคลีอิกที่สกัดจากไวรัสบริสุทธิ์ PSIV-SN โดยวิธี phenol/chloroform extraction มีคุณภาพค่อนข้างดี โดยพบแถบที่ชัดเจน (sharped band) เพียงแถบเดียว มีขนาดประมาณ 10 กิโลเบส (ภาพที่ 5) ส่วนที่ปรากฏเป็นปื้น (smeared band) ด้านล่างของเจล คือ กรดนิวคลีอิกที่เกิดการ degradation ในระหว่างขั้นตอนการสกัด

เมื่อย่อยกรดนิวคลีอิกด้วยเอนไซม์ *RNase A* และ *DNase I* พบว่ากรดนิวคลีอิกของเชื้อ PSIV-SN ทนทานต่อการถูกย่อยด้วย *DNase I* แต่ไม่ทนทานต่อ *RNase A* ทั้งในสภาพ low salt (0.1 x SSC) และ high salt (2 X SSC) นั่นคือ มีคุณสมบัติเป็น single stranded RNA (Siriwong, 1995)



ภาพที่ 4 รูปแบบของแถบโปรตีนจากใบถั่วลิสงปกติ (H) และ ใบถั่วลิสงเป็นโรคเนื่องจากเชื้อ peanut stripe virus-severe necrotic strain (D) และอนุภาคไวรัสบริสุทธิ์ (V) เมื่อแยกบนตัวกลางเจลที่มีความเข้มข้นต่างๆ 3 ระดับ (8, 10 และ 12% gel)
 M = โปรตีนมาตรฐาน (Pharmacia) มีขนาดดังนี้ phosphorelase b, 94,000; bovine serum albumin, 67,000; ovalbumin, 43,000; carbonic anhydrase, 30,000; soybean trypsin inhibitor, 20,100 และ lactalbumin, 14,400 คาลคิน ตามลำดับ
 ตัวเลขในภาพ = น้ำหนักโมเลกุล (M.W.) ของหน่วยโปรตีนห่อหุ้มเชื้อ PSIV-SN ที่คำนวณได้จากอัตราค่าการเคลื่อนย้ายของโปรตีนในแต่ละระดับของ % gel
 ลูกศรชี้ แสดงตำแหน่งของโปรตีน M.W. 70,000 คาลคิน



ภาพที่ 5 RNA ที่แยกสกัดได้จากอนุภาคเชื้อ peanut stripe virus-severe necrotic strain โดยวิธี phenol/chloroform extraction แล้ววิเคราะห์ขนาดโดย 1 % agarose gel electrophoresis
M = λ -DNA/*Hind* III markers

2.1 การโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มของเชื้อ PSIV-SN

ทดลองใช้ระบบ RT-PCR สำหรับโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มของเชื้อ PSIV-SN ในเบื้องต้นก่อน โดยได้รับความอนุเคราะห์ primers ของไวรัสในวงศ์ (family) เดียวกันกับ PSIV-SN จาก ดร. พิศสุวรรณ เจริมสมบัติ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการและ Dr. Ralf Dietzgen ซึ่งประสบผลสำเร็จเป็นอย่างดี ทำให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มของเชื้อ PSIV-SN ในบางส่วน (665 นิวคลีโอไทด์, GenBank accession number AF 079116) โดยมีขั้นตอนวิธีการทดลองดังต่อไปนี้

ก. การโคลนยีนด้วยเทคนิค RT-PCR

วิธีทดลอง

- การแยกสกัดกรดนิวคลีอิกจากใบถั่วลิสงเป็นโรค

ใช้วิธีการของ Hammond and Lawson (1988) คือ นำใบถั่วลิสงที่แสดงอาการเนื่องจากเชื้อ PSIV-SN มา 1 ใบย่อย บดในโกร่งแช่เย็นโดยเติม buffer A (0.5 M potassium phosphate, pH 8.3, 0.5% (W / V) sodium sulfite) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (μ l) บดจนละเอียด จึงดูดน้ำคั้นพืชใส่ลงในหลอด microcentrifuge ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ/นาที ที่ 4°C นาน 10 นาที ดูดน้ำใสใส่ลงในหลอดใหม่ ปรับปริมาตรให้เป็น 500 μ l ด้วย buffer A แล้วเติมสารละลาย buffer B (5% Triton X-100, 4% PEG (6000), 0.1 M NaCl) ปริมาตร 500 μ l ผสมให้เข้ากันดีแล้วบดบนน้ำแข็ง นาน 1 ชั่วโมง จึงปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที ที่ 4°C นาน 10 นาที ดูดส่วนน้ำใสออกให้หมดแล้วละลายตะกอนด้วย TE buffer, pH 8.0 ปริมาตร 10 μ l เก็บรักษาไว้ที่ -80°C จนกว่าจะนำมาสังเคราะห์ cDNA

- ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ specific primers

primers ชุดที่ 1 (PST primers) จำเพาะกับเชื้อ peanut stripe virus-blotch strain ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. R. Dietzgen (University of Queensland, Australia) โดยตำแหน่งของ primer บนจีโนมของเชื้อ และทิศทางการแสดงไว้ในภาพที่ 6 ก และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer มีดังนี้

PST-1 : 5' GCA TGC CCT CGC CAT TGC AA 3' (20 mer)

PST-2 : 5' GCA CAC ACT TCT TGG CAT GG 3' (20 mer)

PST-4 : 5' TAC ATA GCA GAA TCA GCA CT 3' (20 mer)

primers ชุดที่ 2 (CAMV primers) ออกแบบจากจีโนมของเชื้อ cowpea aphid-borne mosaic virus (CAMV) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. พิศสุวรรณ เจริมสมบัติ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะกับบางส่วนของยีน replicase และยีนโปรตีนห่อหุ้ม ดังแสดงไว้ในภาพที่ 6 ข โดย primers มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังต่อไปนี้

CAMV-AV1 : 5' CCA AGC TTT TAC TGC GGG GAA C 3' (22 mer)

CAMV-V1 : 5' GCG AAT TCT CAG GAA CTG GAC 3' (21 mer)

CAMV-FP : 5' GTC CCA CGG CTT CAA AAG ATC -3' (21 mer)

CAMV-RP : 5' CCC ATG CCA AGA AGT GTG TG -3' (20 mer)

- การสังเคราะห์ cDNA และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RT-PCR

เจือจางกรดนิวคลีอิกที่เตรียมไว้ข้างต้นด้วย DEPC-treated water ที่ระดับเจือจาง 1:20 และ 1:100 เท่า ก่อนใช้เติมในปฏิกิริยา reverse transcription reaction ผสม 2 μ L ของสารละลายกรดนิวคลีอิกเจือจางที่ เตรียมไว้ กับ 2 μ L ของ specific reverse primer (15 μ M / μ L ปมที่อุณหภูมิ 75 $^{\circ}$ C 5 นาที แล้ววางบนน้ำแข็งทันที ตั้งไว้นาน 3 นาทีจึงเติม 16 μ L RT-master mix และ 0.4 μ L ของ M-MLV reverse transcriptase (200 Units/ μ L, Promega) แล้วนำเข้าเครื่อง DNA Thermal Cycler (Hybaid) ตั้งโปรแกรมคือ 25 $^{\circ}$ C 10 นาที และ 42 $^{\circ}$ C 60 นาที และ 95 $^{\circ}$ C 5 นาที ตามลำดับ ได้เป็น first strand cDNA solution

สังเคราะห์ second strand cDNA พร้อมกับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสายคู่โดยปฏิกิริยา PCR โดยการผสม 10 μ L ของ first strand cDNA solution กับ 40 μ L ของ PCR reaction mix ซึ่งประกอบด้วย 4 μ L 10X Taq DNA polymerase buffer (Promega), 2 μ L ของ 25 μ M MgCl₂, 4 μ L ของ 10 mM dNTPs mix, 1 μ L ของ reverse primer (15 μ M / μ L), 1 μ L ของ forward primer (15 μ M / μ L), 0.5 μ L Taq DNA polymerase และ 28 μ L sterile-distilled water นำเข้าเครื่อง DNA Thermal Cycler (Hybaid) ตั้งโปรแกรม ดังนี้ อุณหภูมิ 94 $^{\circ}$ C 4 นาที จำนวน 1 รอบ ; 94 $^{\circ}$ C 2 นาที , 55 $^{\circ}$ C 1 นาที , 72 $^{\circ}$ C 1.30 นาที ตามลำดับ ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ; 72 $^{\circ}$ C 10 นาที จำนวน 1 รอบ เมื่อครบเวลานำ PCR product มาวิเคราะห์บน 1.5 % agarose gel , 1/2 X TBE buffer ย้อมเจลด้วย ethidium bromide ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วย UV Transilluminator

- การโคลน cDNA

แยกเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากอะกาโรสเจลโดยใช้ Gene Clean Kit (Bio 101) ตามวิธีการที่ระบุไว้ในคู่มือ ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดย gel electrophoresis แล้วนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ pGEM-T (Promega) (ภาพที่ 8) โดยอาศัยเอนไซม์ T4 DNA ligase ที่อุณหภูมิ 40 $^{\circ}$ C นาน 16 ชั่วโมง ส่งถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์ของเชื้อ *E. coli* JM 109 โดยวิธีการ heat-shock transformation (Sambrook et al, 1989) เขย่าส่วนผสมในอาหารเหลว SOC เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง จึงนำ

ไป spread บนอาหารคัดเลือก LB ที่เติมแอมพิซิลิน, IPTG และ X-gal ปกติ 37°C ข้ามคืน คัดเลือก โคลนที่มีสีขาวขึ้นมาตรวจสอบพลาสมิด

- **การวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอพลาสมิด**

แยกสกัดพลาสมิดจากโคลนที่คัดเลือกไว้ โดยวิธี miniprep alkaline lysis (Sambrook *et al.*, 1989) วิเคราะห์ขนาดของพลาสมิดในสภาพก่อนและหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*ZI โดยการแยกบนอะกาโรสเจล (1%) และบัฟเฟอร์ 1 X TAE เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ -DNA/*Hind*III)

- **การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์**

แยกสกัดดีเอ็นเอจากโคลนที่คัดเลือกไว้ ด้วยวิธี miniprep alkaline lysis ทำดีเอ็นเอให้สะอาด ด้วย phenol / chloroform extraction สำหรับนำมาเป็น DNA template ตามวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในระบบ dideoxy chain termination (Sanger, 1967) โดยใช้ ALFexpress™ AutoCycle™ Sequencing Kit (Amersham) และเครื่องหาลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ ALFexpress™ (Pharmacia) ตามวิธีการที่ระบุไว้ในคู่มือการใช้เครื่อง หาลำดับนิวคลีโอไทด์จากปลายทั้งสองข้างของ inserted cDNA จากแต่ละโคลนโดยใช้ ALFred M13-40 primer และ ALFred M13 Reverse primer แล้ววิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม DNASIS(HITACHI) VERSION 3.7

ก.



ข.



ค.



ภาพที่ 6 แสดงโครงสร้างของจีโนมโพทิวไรส ตำแหน่งและทิศทางของ specific primers สำหรับโคลนนิ่งเชื้อ PSIV-severe necrotic strain โดยเทคนิค RT-PCR

ก. แผนภาพโครงสร้างจีโนมของโพทิวไรส

ข. ภาพขยายจีโนมบางส่วนของเชื้อ PSIV-blotch แสดงตำแหน่งและ ทิศทางของ primers PST-1, PST-2 และ PST-4

ค. ภาพขยายจีโนมบางส่วนของเชื้อ CAMV แสดงตำแหน่งและทิศทางของ primers CAMV-FP, CAMV-RP, CAMV-V1 และ CAMV-AVI

ผลการทดลอง

เมื่อใช้ primers ที่จำเพาะกับเชื้อ PSIV -blotch strain โดย primers คู่แรกคือ PST-1 / PST-2 ให้ RT-PCR product ขนาดประมาณ 230 bp ส่วน primers คู่ที่ 2 คือ PST-1 / PST-4 ไม่พบ PCR product ขนาดตรงตามที่คาดไว้ (ประมาณ 1,200 bp) พบเฉพาะ non-specific PCR products ขนาดประมาณ 200 และ 600 bp (ภาพที่ 7)

เมื่อใช้ primers จำเพาะกับเชื้อ CAMV พบว่า primers CAMV-RP / CAMV-FP ให้ PCR product ขนาดประมาณ 650-700 bp ตรงตามที่คาดหมายไว้ ส่วน primers CAMV-AV1 / V1 ไม่มีการสร้าง RT-PCR products จากจีโนม ของ PSIV-SN (ภาพที่ 7) โดยที่เมื่อใช้กรดนิวคลีอิกที่สกัดจากใบแก้วที่เป็นโรคเนื่องจากเชื้อ CAMV มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ พบว่า ได้ PCR- product ขนาดประมาณ 1.2 kb ตามที่คาดหมายไว้

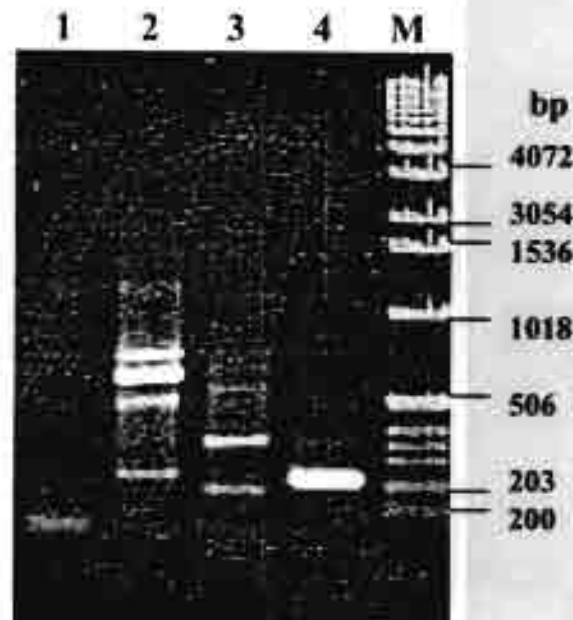
หลังจากเชื่อมต่อดีเอ็นเอของ RT-PCR products เข้ากับพาหะ pGEM-T (Promega) แล้วส่งถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ได้เป็น recombinant clones ของเชื้อ PSIV-SN จำนวน 38 โคลน ดังตัวอย่างที่แสดงในภาพที่ 9 คือโคลน pGEM-NC28, pGEM-NC53, pGEM-NC67, pGEM-NC68, pGEM-NC79, pGEM-NC81, pGEM-NC 90 , pGEM-NC91 และ pGEM-NC93

ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ inserted cDNA ในโคลน pGEM-NC28 และ pGEM-NC67 พบว่า ทั้งสองโคลนมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน โดยมีลำดับของ primers ที่ใช้ในการทำ RT-PCR อยู่ปลายทั้งสองข้าง โดยมีความยาวของ insert cDNA รวมทั้งสิ้น 665 นิวคลีโอไทด์ (GenBank accession number AF 079116) (ภาพที่ 10)

จากการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนโดยโปรแกรม DNASIS พบว่า Open Reading Frame (ORF) ที่ 1 เป็น long ORF ไม่มีจุดหยุด (stop codon) ภายใน ได้เป็นลำดับกรดอะมิโนจำนวน 221 เรซิดิว ซึ่งจากการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้ม (coat protein) ของเชื้อ PSIV-blotch strain (accession number U05771, Gunasinghe *et al.*, 1993) และ PSIV strain T6/97 (accession number AF073380, Siri Wong *et al.*, unpublished) พบว่าลำดับในดีเอ็นเอขนาด 665 นิวคลีโอไทด์นี้มี % ความเหมือน (homology) กับเชื้อ PSIV-blotch และ PSIV-T6/97 และเหมือนกัน 96.2 % เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนห่อหุ้ม พบว่า PSIV-SN มีความเหมือนกับ PSIV-blotch strain และ PSIV-strain T6/97 เท่ากับ 95.6 % และ 95.9 % ตามลำดับ แสดงว่า ดีเอ็นเอขนาด 665 นิวคลีโอไทด์ที่ได้จากโคลน pGEM-NC28 และ pGEM-NC 67 นี้เป็นส่วนหนึ่งของยีนโปรตีนห่อหุ้มของเชื้อ PSIV-SN

เมื่อทำ alignment ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนห่อหุ้มเชื้อ PSIV-SN ที่ทราบแล้วกับเชื้อ PSTV-T6/97 และ PSIV-blotch โดยวิธี maximum matching ทำให้คาดการณ์ได้ว่ายังขาดส่วนของกรดอะมิโน

ทางด้าน N-terminal ประมาณ 60-61 เรสิดิวส์ และทางด้าน C-terminal อีกประมาณ 4 เรสิดิวส์ (ภาพที่ 11) จึงจะได้เป็นโปรตีนห่อหุ้มที่สมบูรณ์ของเชื้อ PSIV-SN



ภาพที่ 7 RT-PCR products จากการใช้กรดนิวคลีอิกจากใบที่สงสัยเป็นโรคจากเชื้อ peanut stripe virus-severe necrotic strain เป็นต้นแบบ ร่วมกับ primers ชนิดต่างๆ ตรวจแยกขนาดบน 1.5% agarose gel

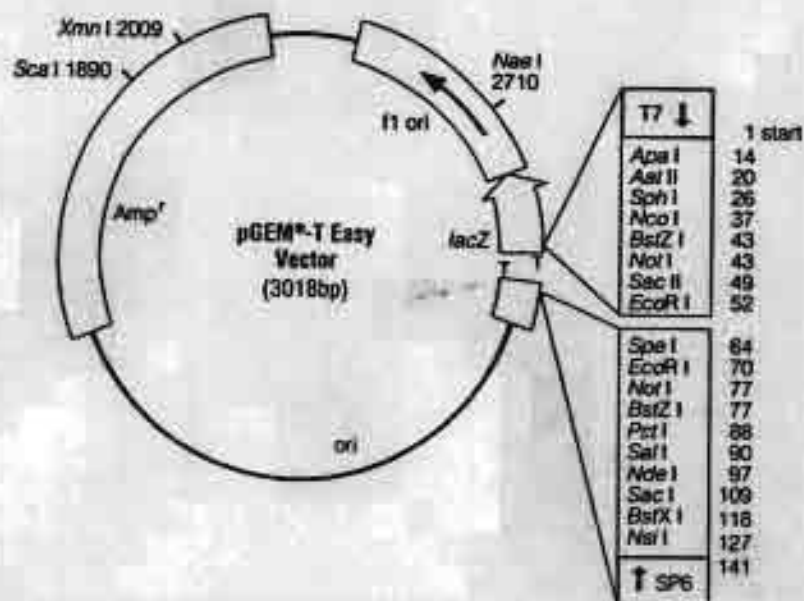
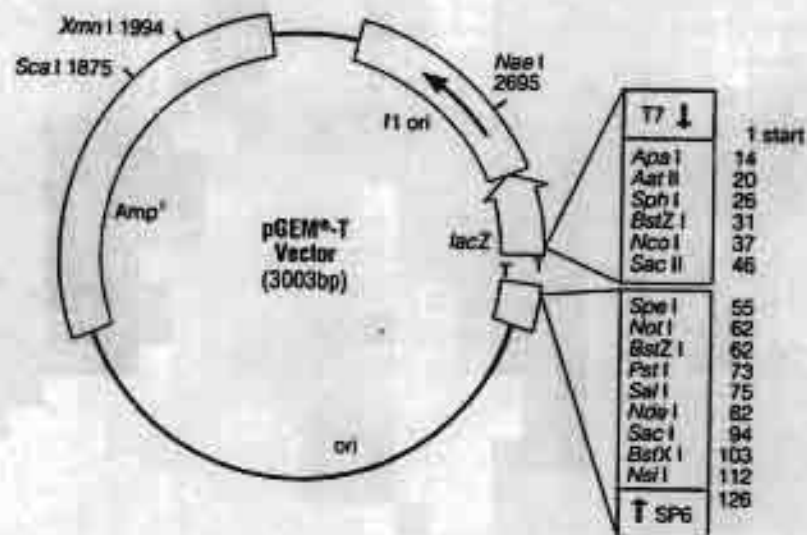
ช่อง 1 = primers CAMV-AV1 / CAMV-V1

ช่อง 2 = primers CAMV-RP / CAMV-FP

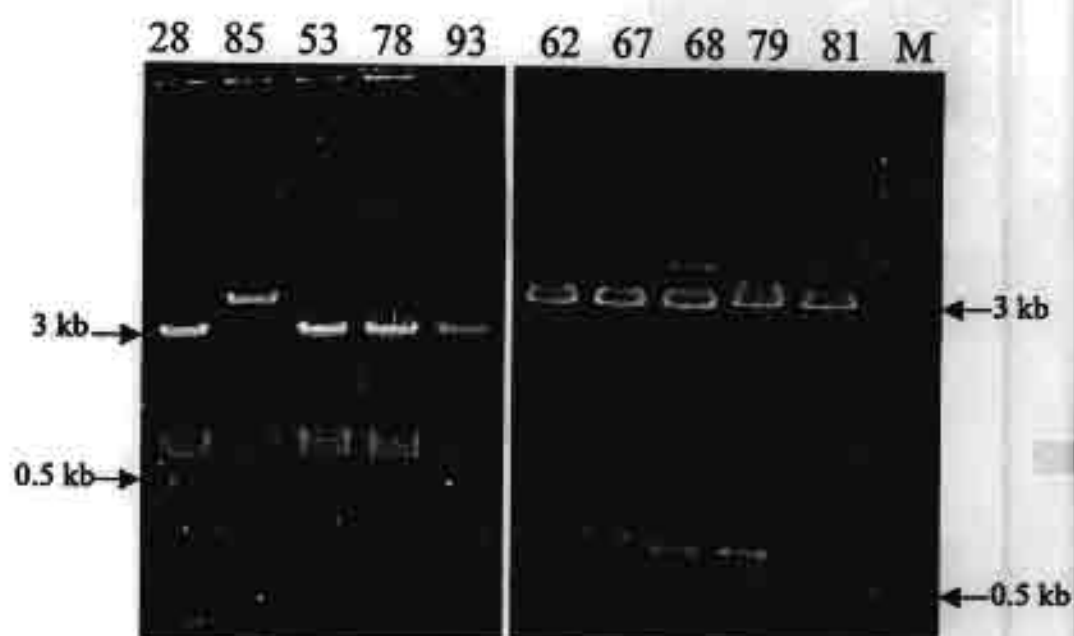
ช่อง 3 = primers PST-1 / PST-4

ช่อง 4 = primers PST-1 / PST-2

M = 1 kb DNA ladder แสดงขนาดเป็นตัวเลขทางขวามือ หน่วยเป็น bp



ภาพที่ 8 Plasmid map ของ pGEM-T และ pGEM-T easy cloning vectors
(ที่มา : Promega instruction manuals)



ภาพที่ 9

รูปแบบของดีเอ็นเอจากโคลน pGEM-NC ต่างๆ หลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Bst*ZI

หมายเลขแต่ละช่องเจล = หมายเลขประจำตัวของโคลน pGEM-NC ;

M = λ DNA / *Hind*III ;

ลูกศรชี้ แสดงตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอตามขนาดที่ระบุไว้ หน่วยเป็นกิโลเบส (kb)

```

      10      20      30      40      50      60
GTCCCACGGC TTCAAAAGAT CACAAAGAAA ATGAATTTGC CAATGGTGAA AGGGAATGTG

      70      80      90     100     110     120
ATCTTGAATT TAGACCATCT GTTAGATTAC AAGCCAGAGC AAAGTATCT TTTCAACACA

     130     140     150     160     170     180
AGAGCAACAA AGATGCAGTT TGAATGTGG TACAATGCTG TGAAGGTGCA GTATGAAATA

     190     200     210     220     230     240
GATGATGAAC AGATGTCAAT TGTGATGAAT GGCTTTATGG TGTGGTGTAT TGACAATGGC

     250     260     270     280     290     300
ACTTCACCAG ATGTGAATGG AACATGGGTG ATGATGGATG GAGATGAGCA AGTGGAAATAT

     310     320     330     340     350     360
CCTCTCAAAC CAATGGTTGA AAATGCAAAA CCAACACTTC GTCAAATCAT GCACCATTTT

     370     380     390     400     410     420
TCAGATGCAG CTGAAGCATA TATTGAGATG AGAAATTCTG AACGACCGTA CATGCCTAGG

     430     440     450     460     470     480
TACGGATTGC TTCGGAATTT GAGGGATAAA AATCTAGCTC GCTACGCTTT CGACTTCTAT

     490     500     510     520     530     540
GAAGCAACTT CTAAGACATC AGATCGTGCA AGGGAAGCAG TAGCACAGAT GAAGGCAGCA

     550     560     570     580     590     600
GCCCTCAGCA ATGTTAACAG CAAGTTGTTT GGACTTGATG GGAATGTGGC AACAACCAGC

     610     620     630     640     650     660
GAGAATACTG AAAGGCACAC TGCAAAGGAC GTCAATCAGA ACATGCACAC ACTTCTTGGC

     670     680     690     700     710     720
ATGGG.....

```

ภาพที่ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ที่สังเคราะห์จาก RNA ของเชื้อ PSIV-SN เป็นต้นแบบ จำนวน 665 นิวคลีโอไทด์ จากโคลน pGEM-NC28 และ pGEM-NC67 ส่วนที่ขีดเส้นใต้หมายถึงส่วนของ CAMV-FP primer และ complementary ของ CAMV-RP primer ตามลำดับ

ก. Matching Percentage (Total Window: 75%, Alignment Window: 97%)

1	SGSSTTQSPVLDAGVDTAKDKKEKSNKKGKGPESSESGMNSRGTEHQSMR	50
-61		-12
51	DKDVNAGSKGKIVPRLQKITKRMNLPNVKGNVILNLDHLLDYKPEQTDLF	100
-11	VPRLQKITKRMNLPNVKGNVILNLDHLLDYKPEQTDLF	38
101	NTRATKMQFEMWYNAVKGGEYEDDEQMSIVMNGFMVWCIDNGTSPDVNGT	150
39	NTRATKMQFEMWYNAVKGVEYEDDEQMSIVMNGFMVWCIDNGTSPDVNGT	88
151	WVMMDGDEQVEYPLKPMVENAKPTLRQIMHHFSDAAEAYIEMRNSERPYN	200
89	WVMMDGDEQVEYPLKPMVENAKPTLRQIMHHFSDAAEAYIEMRNSERPYN	138
201	PRYGLLRNLRDKNLARYAFDFYEVTSTKSDRAREAVAQMAAALSNVNSK	250
139	PRYGLLRNLRDKNLASAFDFYEATSTKSDRAREAVAQMAAALSNVNSK	188
251	LFGLOGNVATTSENERHTARDVNQNMHTLLGMSAQ*.....	300
189	LFGLOGNVATTSENERHTAKDVNQNMHTLLGM.....	238

ข. Matching Percentage (Total Window: 73%, Alignment Window: 95%)

1	SGSSTQPPVVDAGVDTGKDEKEKSNKKGKSESSESGMNSRGTEHQSMRD	50
-60		-11
51	KDVNAGSRGKVPRLQKITKRMNLPNVKGNVILNLDHLLDYKPEQTDLFN	100
-10	VPRLQKITKRMNLPNVKGNVILNLDHLLDYKPEQTDLFN	39
101	TRATKMQFEMWYNAVKGGEYEDDEQMSIVMNGFMVWCIDNGTSPDVNGW	150
40	TRATKMQFEMWYNAVKGVEYEDDEQMSIVMNGFMVWCIDNGTSPDVNGW	89
151	WVMMDGDEQVEYPLKPMVENAKPTLRQIMHHFSDAAEAYIEMRNSERPYN	200
90	WVMMDGDEQVEYPLKPMVENAKPTLRQIMHHFSDAAEAYIEMRNSERPYN	139
201	RYGLLRNLRDKNL-SCYAFDFYEVTSTKSGRAREAVAQMAAALSNVNSK	250
140	RYGLLRNLRDKNLAS-YAFDFYEATSTKSDRAREAVAQMAAALSNVNSK	189
251	LFGLOGNVATTSENERHTARDVNQNMHTLLGMSAQ*.....	300
190	LFGLOGNVATTSENERHTAKDVNQNMHTLLGM.....	239

ภาพที่ 11 การ alignment ของลำดับกรดอะมิโน 221 เวกทิวิจ จาก inserted cDNA ขนาด 665 นิวคลีโอไทด์ของเชื้อ peanut stripe virus-severe necrotic strain (PSIV-SN) เปรียบเทียบกับยีนโปรตีนห่อหุ้มของเชื้อ PSIV-blotch และ PSIV-T6/97

- ก. File 1 คือ PSIV-blotch strain (accession number U05771); File 2 คือ PSIV-SN
 ข. File 1 คือ PSIV strain T6/97 (accession number AF073380); File 2 คือ PSIV-SN

ข. การโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้ม โดยวิธีมาตรฐาน

ขนาดของยีนโปรตีนห่อหุ้มที่คาดไว้ ควรมีขนาดประมาณ 900 bp แต่ผลจากการโคลนยีนด้วยเทคนิค RT-PCR ข้างต้นได้โคลนที่มีขนาดสั้น (ประมาณ 700 bp) และยังไม่พบ primers ที่เหมาะสมที่จะทำให้ได้ full length ของยีนโปรตีนห่อหุ้ม และครอบคลุมถึงส่วนของ poly A ที่อยู่ด้านปลาย 3' ของจีโนมไวรัส และส่วนยีน replicase ที่อยู่ด้าน upstream ของส่วนปลาย 5' ของยีนโปรตีนห่อหุ้ม ดังนั้นจึงได้เปลี่ยนระบบการโคลนยีนมาใช้เป็นระบบ cDNA cloning ตามวิธีมาตรฐานของ Gubler and Hoffman (1983) โดยใช้ oligo (dT) primers เป็นจุดเริ่มต้นของการสังเคราะห์ cDNA ซึ่งผลการทดลอง ทำให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอย่างสมบูรณ์ และทราบบางส่วนของยีน replicase และ ส่วน 3' non-coding region โดยมีรายละเอียดดังนี้

วิธีทดลอง

- การสังเคราะห์ cDNA และการโคลนเข้าในพาหะ pUC118

แยกสกัด RNA ออกจากอนุภาคไวรัสบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ข้างต้นโดยวิธี phenol / chloroform extraction เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA สร้าง first strand cDNA โดยอาศัยปฏิกิริยาเอนไซม์ MMLV- reverse transcriptase แล้วจึงสังเคราะห์ second strand cDNA โดยอาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์ *RnaseH* และ DNA polymerase, ดัดแปลงส่วนปลายโมเลกุลของ cDNA ให้เป็น blunt end ด้วยเอนไซม์ Klenow fragment ดัดแปลงปลายทั้งสองข้างของโมเลกุล cDNA ด้วยการเติม *EcoRI* / *NorI* adaptor (ภาพที่ 12) เชื่อมต่อเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ pUC118 ตรงตำแหน่ง *EcoRI* (ภาพที่ 13) แล้วส่งถ่ายดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์ *E.coli* JM109 โดยวิธี heat shock transformation (Sambrook et al., 1987) คัดเลือก recombinant clones ในเบื่องค์โดยใช้อาหารคัดเลือก LB ที่เติมแอมพิซิลิน, IPTG และ X-gal วิเคราะห์ขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอหลังจากย่อยด้วยเอนไซม์ *EcoRI*

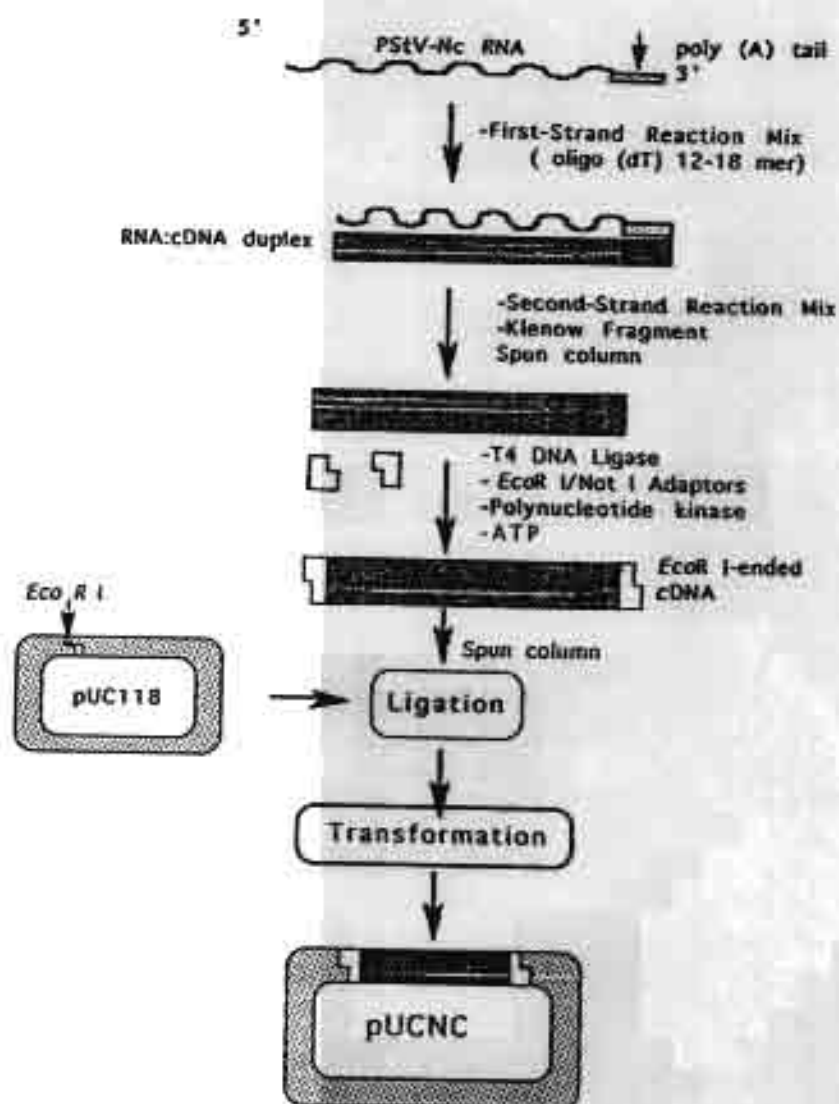
- การคัดเลือกโคลนที่มียีนโปรตีนห่อหุ้มด้วยเทคนิค nucleic acid hybridization

เพื่อคัดเลือกโคลนที่มีส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้มของเชื้อ PSIV-SN จึงใช้วิธี Southern blot hybridization โดยใช้ DNA probe ที่เตรียมได้จาก insert DNA ของโคลน pGEM-NC28 ดัดด้วยเอนไซม์ *SphI* และ *SalI* แยกเฉพาะส่วน insert cDNA ออกจากเจล (low melting agarose gel, Sea Plaque) และสกัดด้วย phenol / chloroform extraction ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethanol precipitation ติดตามโมเลกุลของดีเอ็นเอต้นแบบด้วยสารเคมี ตามวิธีการที่ระบุไว้ในคู่มือการใช้ ECL™ direct nucleic acid labeling and detection System (Amersham) ได้เป็น NC 28 probe สำหรับนำไปทำปฏิกิริยา hybridization กับ DNA จากโคลน pGEM-NC ต่างๆ (ภาพที่ 14) ที่ย้ายลงบน nylon membrane ตามวิธีการ Southern transfer ของ Sambrook et al. (1987) ไฮบริไดซ์ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 42°C แล้วล้าง

NC28 probe ส่วนเกินออกด้วย Wash buffer 1 (0.5 X SSC + 0.4% SDS) 2 x 10 นาที ที่ 55°C และ Wash buffer 2 (2 x SSC) 2 x 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบการเกิดไฮบริดเชนบนแผ่น nylon หลังจากเติมสารละลาย substrates โดยใช้แผ่นฟิล์มเอกซ์เรย์รับสัญญาณ

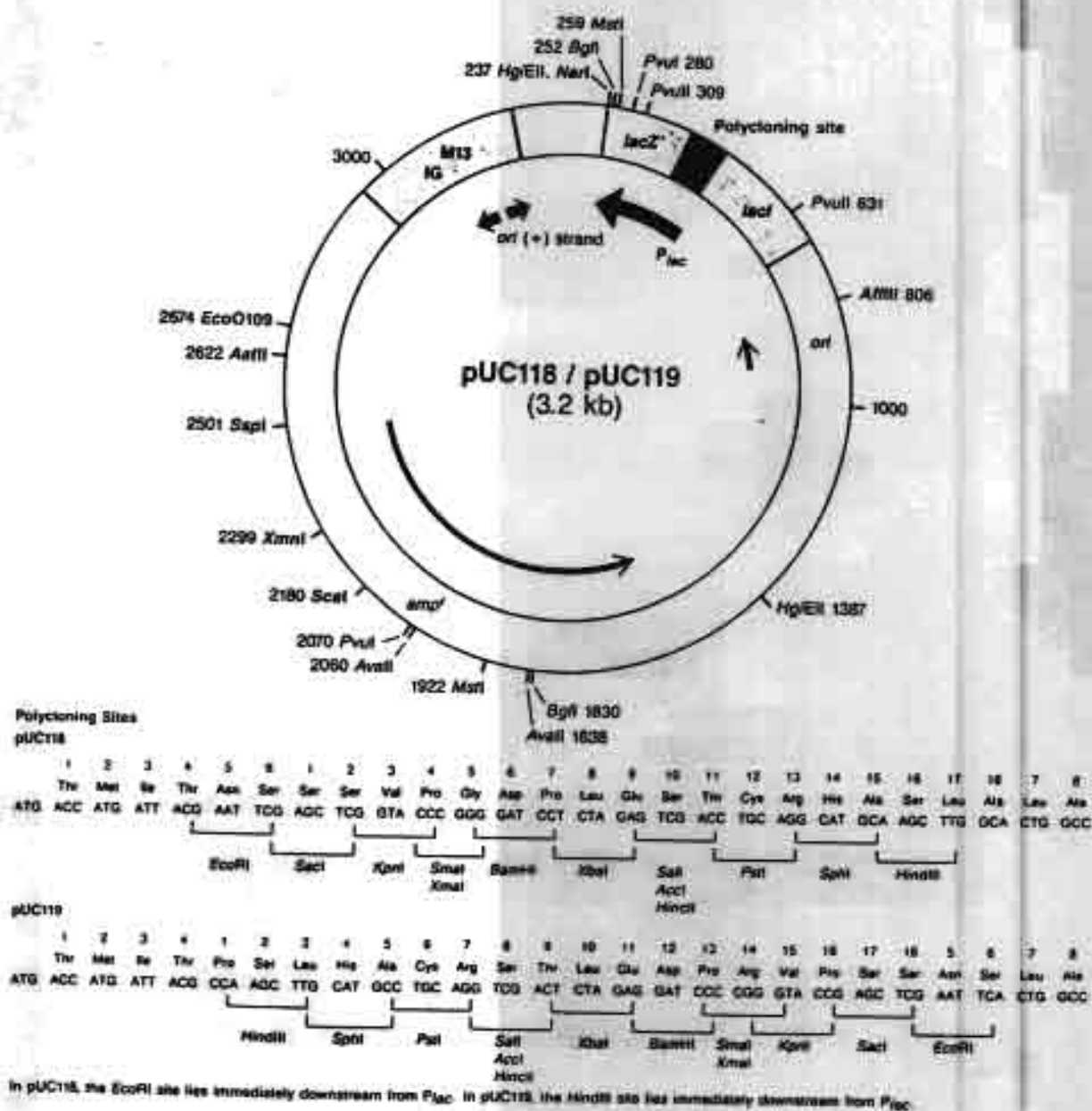
• ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และวิเคราะห์โครงสร้างยีน

แยกสกัดดีเอ็นเอจากโคลนที่ให้ผลไฮบริดซ์กับ NC28 DNA probe ด้วยวิธี miniprep alkaline lysis ทำให้สะอาดด้วย phenol / chloroform extraction สำหรับนำมาเป็น DNA template เพื่อตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ตามระบบ dideoxy chain termination (Sanger, 1967) โดยใช้ ALFexpress™ AutoCycle™ Sequencing Kit (Amersham) และเครื่องหาลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ ALFexpress™ (Pharmacia) ตามวิธีการที่ระบุไว้ในคู่มือการใช้เครื่อง โดยใช้ ALFred M13-40 primer และ ALFred M13 Reverse primer วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม DNASIS (HITACHI) VERSION 3.7



ภาพที่ 12

ขั้นตอนการโคลนยีนของเชื้อ peanut stripe virus-severe necrotic strain ตามวิธีมาตรฐานของ Gubler and Hoffman (1983) โดยใช้ RNA จากอนุภาคไวรัสบริสุทธิ์เป็นต้นแบบ และ cDNA synthesis kit (Pharmacia) และ pUC118 vector



ภาพที่ 13 Plasmid map ของพลาสมิด pUC118/119
(ที่มา : Sambrook et al., 1989)

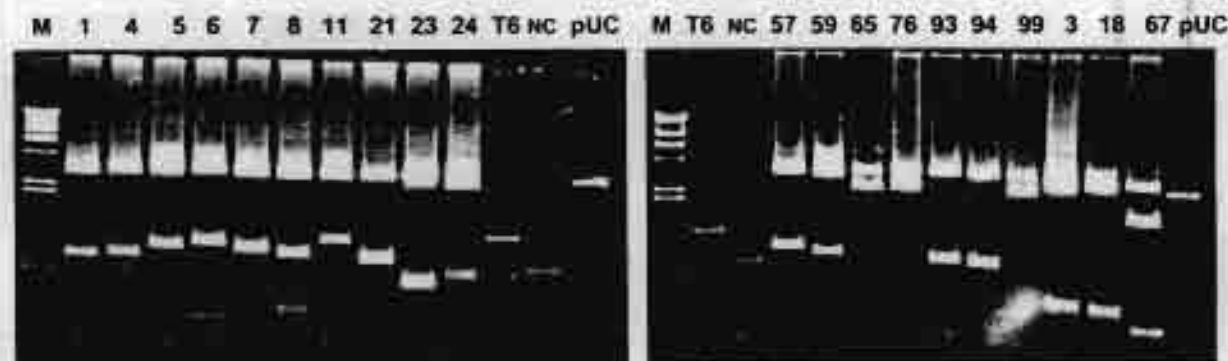
ผลการทดลอง

คัดเลือกโคลนสีขาวไว้จำนวน 99 โคลน พบว่าเป็นโคลนที่มี insert cDNA ขนาดใหญ่ จำนวน 38 โคลน เมื่อตรวจสอบรูปแบบของพลาสมิดหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* สามารถแยกโคลนที่ได้ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

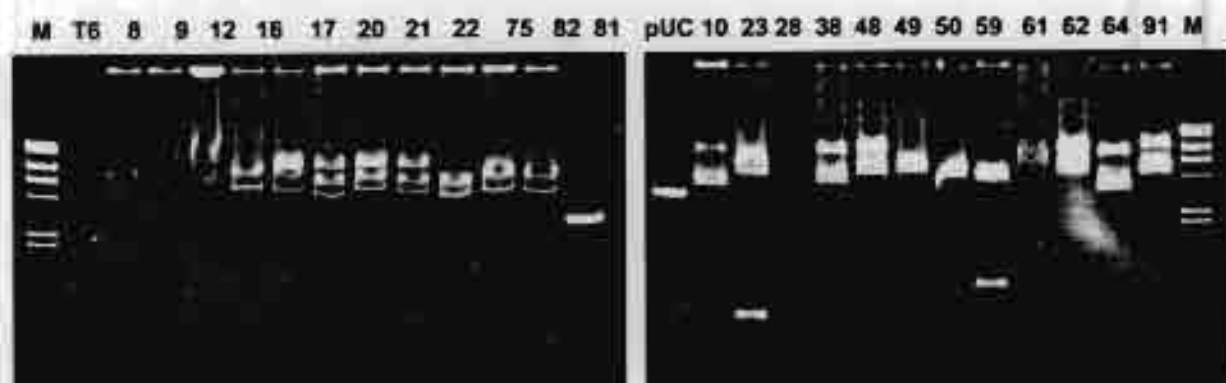
- (1) กลุ่มที่มี insert cDNA ขนาดประมาณ 200-700 bp มีจำนวน 17 โคลน ได้แก่ โคลน pUCNC 1, pUCNC3, pUCNC4, pUCNC5, pUCNC 6, pUCNC7, pUCNC13, pUCNC11, pUCNC23, pUCNC14, pUCNC17, pUCNC18, pUCNC57, pUCNC67, pUCNC59, pUCNC93 และ pUCNC94 (ภาพที่ 14 ก)
- (2) กลุ่มที่มี insert cDNA ขนาดประมาณ 1,000 - 1,200 bp แต่มีปัญหาในการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ไม่สามารถแยกเฉพาะส่วนของ insert cDNA ออกจากที่เอ็นแอฟาหะได้ เมื่อใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เท่ากัน ได้เป็นเพียง lineared form ของโมเลกุลสายผสมเท่านั้น มีจำนวน 21 โคลน ได้แก่ โคลน pUCNC8, pUCNC9, pUCNC10, pUCNC12, pUCNC 16, pUCNC17, pUCNC20, pUCNC21, pUCNC22, pUCNC38, pUCNC48, pUCNC49, pUCNC50, pUCNC61, pUCNC62, pUCNC64, pUCNC75, pUCNC81, pUCNC82, และ pUCNC91 (ภาพที่ 14 ข)

ผลการคัดเลือกโคลนด้วย NC28 DNA probe พบว่า โคลน pUCNC ต่างๆ ในกลุ่มที่ 1 (มี insert cDNA ขนาดประมาณ 200-700 bp) ไม่เกิดสัญญาณไฮบริดซ์ ในขณะที่โคลนจากกลุ่มที่ 2 (มี insert cDNA ขนาดประมาณ 1,000-1,200 bp) เกิดสัญญาณไฮบริดซ์กับ probe อย่างชัดเจน มีจำนวน 13 โคลน ได้แก่ โคลน pUCNC8, pUCNC9, pUCNC10, pUCNC12, pUCNC17, pUCNC20, pUCNC21, pUCNC22, pUCNC38, pUCNC48, pUCNC62, pUCNC64 และ pUCNC 91 (ภาพที่ 15)

ก.



ข.



ภาพที่ 14

ขนาดของ insert DNA จากโคลน pUCNC หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* แล้ววิเคราะห์บน 1 % agarose gel electrophoresis

ก. โคลน pUCNC กลุ่มที่ 1 มี insert cDNA ขนาดตั้งแต่ 200-700 bp

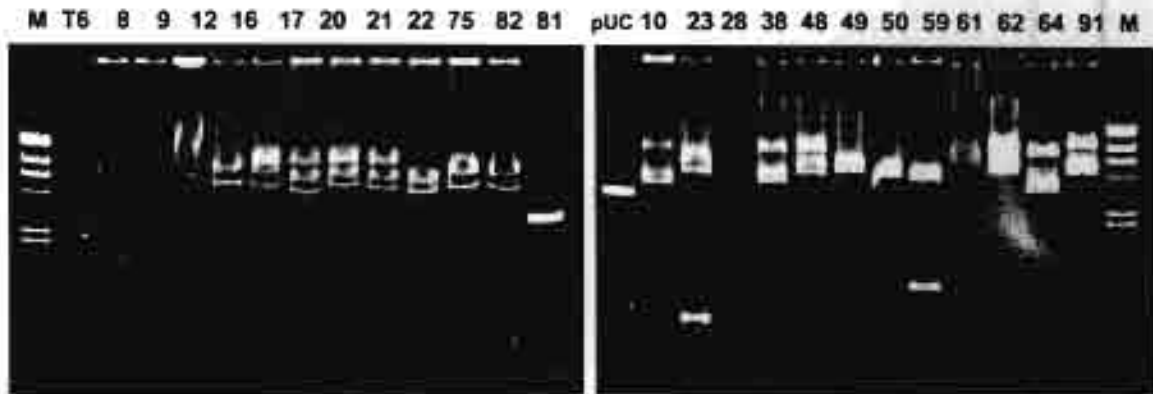
ข. โคลน pUCNC กลุ่มที่ 2 มี insert cDNA ขนาด 1000-1200 bp แต่ไม่สามารถตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ได้อย่างสมบูรณ์ ยกเว้นโคลน pUCNC23 และ pUCNC59 มี insert cDNA ขนาด 500 และ 700 bp ตามลำดับ

M = λ DNA/*Hind* III (ขนาด 23.1, 9.4, 4.3, 2.3, 2.0 และ 0.56 kb ตามลำดับ).

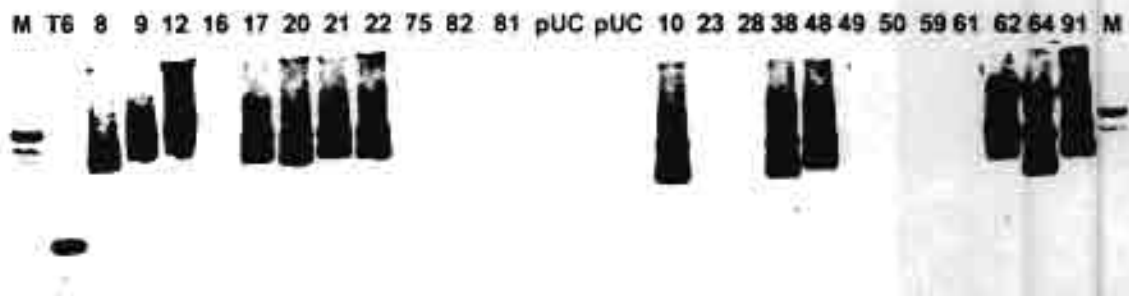
pUC = pUC118 / *EcoRI* (3.2 kb), T6 = insert DNA จากโคลนของ PSIV strain T6/97 (1.2 kb); NC = insert cDNA จากโคลน pGEM-NC28 (ขนาด 665 bp)

ตัวเลข = หมายเลขของโคลน pUCNC

ก.



ข.



ภาพที่ 15

การคัดเลือกโคลน pUCNC ที่มียีนโปรตีนห่อหุ้มของเชื้อ peanut stripe virus-severe necrotic strain โดยเทคนิค southern blot hybridization

- ก. รูปแบบดีเอ็นเอจากโคลน pUCNC กลุ่มที่ 2 หลังจากย่อยด้วยเอนไซม์ *EcoRI* แล้ว แยกบน 1% agarose gel; M = λ DNA/*Hind* III (ขนาด 23.1, 9.4, 4.3, 2.3, 2.0 และ 0.56 kb ตามลำดับ), pUC = pUC118 / *EcoRI* (3.2 kb), T6 = insert DNA จากโคลนของ PSIV strain T6/97 (1.2 kb)
- ข. Southern blot hybridization ของดีเอ็นเอจากโคลน pUCNC จากภาพ ก. หลังจากไฮบริไดซ์กับ NC28 DNA probe ที่จำเพาะกับยีนโปรตีนห่อหุ้มของเชื้อ PSIV-SN pUC = pUC118 / *EcoRI* ไม่มีสัญญาณไฮบริไดซ์กับ NC28 probe; T6 = insert DNA จากโคลนของ PSIV-T6/97 มีสัญญาณไฮบริไดซ์กับ NC28 probe; M = λ DNA/*Hind* III ไฮบริไดซ์กับ λ DNA/*Hind* III probe

หลังจากตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ inserted cDNA จากโคลนซึ่งมีขนาด insert DNA ประมาณ 1-1.2 kbp และไฮบริดกับ NC28 DNA probe ที่จำเพาะกับยีนโปรตีนห่อหุ้มของ PSIV-SN จำนวน 7 โคลน คือ pUCNC8, pUCNC9, pUCNC 10, pUCNC12, pUCNC22, pUCNC48 และ pUCNC 64 พบว่า ทั้ง 7 โคลนมีขนาดของ insert DNA ใกล้เคียงกัน และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะกับ *EcoRI* ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ vector DNA และ *EcoRI* adapter ที่ใส่เข้าไปในขั้นตอนการ cloning มีการเปลี่ยนแปลงไป จึงเป็นสาเหตุให้ การตัด insert DNA ออกจาก vector DNA ด้วย *EcoRI* ไม่ประสบความสำเร็จ

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบแล้วทั้งหมดของเชื้อ PSIV-SN ที่ได้จากการโคลนครั้งนี้มาเปรียบเทียบและเชื่อมต่อกัน (connection) ทำให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 1,176 นิวคลีโอไทด์ ซ้อนทับกับส่วนของ 665 นิวคลีโอไทด์ที่ทราบมาแล้วด้วยเทคนิค RT-PCR เมื่อแปลรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นกรดอะมิโน พบว่า Open Reading Frame 1 เป็น long ORF ไม่มีจุดหยุด (stop codon) อยู่ภายใน ได้ลำดับกรดอะมิโนจำนวน 331 เรสิดิวส์ ต่อด้วยส่วนของ termination codon (TAG) และ 3' non-coding region จำนวน 196 นิวคลีโอไทด์ ส่วนของจีโนมเอนไซม์รีเพลเคสลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1 - 131 (ภาพที่ 16) คาดว่าเป็นส่วนหนึ่งของยีน replicase (N1b gene) เมื่อพิจารณาตามแบบแผนของการจัดระบบยีน (genome organization) ของไวรัสในจีนัส *Potyvirus*

ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสใน ORF 1 มีจำนวน 331 เรสิดิวส์ พบว่ามี putative cleavage site สำหรับยีนโปรตีนห่อหุ้มของ *Potyvirus* คือ glutamine / serine (Q / S) ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโน 42-43 และมี DAG motif ซึ่งเกี่ยวข้องกับความสามารถในการถ่ายทอดไวรัสด้วยเพลียออนอยู่ที่ตำแหน่ง 11-13 หลังจาก cleavage site

สรุปได้ว่า ยีนโปรตีนห่อหุ้มเชื้อ PSIV-SN มีความยาวทั้งสิ้น 861 นิวคลีโอไทด์ (รวมทั้ง termination codon) แปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนได้จำนวน 286 เรสิดิวส์ คำนวณน้ำหนักโมเลกุลโดยโปรแกรม DNASIS ได้ 31,980.26 ดาลตัน สอดคล้องกับผลที่ได้จากการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคโดยวิธี SDS-PAGE (32,000 ดาลตัน ที่ 12 % gel)

DNASIS Translation Editor

3	ATAGCAGAATCAGCACTCAAAACACCTTTACACCAACAAAGGAACAAGAATTGAAGAGTTGGCAAAGTATTTGGCCGTGCTT	83
1	I A E S A L K T L Y T N K G T R I E E L A K Y L A V L	27
84	GATTTTGATTATGAAGTTGGATGTGGAGAATCTGTGCATCTACAATCAGGGAGCAGCACACAACCACAGTGGTGGATGCT	164
28	D F D Y E V G C G E S V H L Q / S G S S T Q P P V V D A	54
165	GGCGTGGATACTGGCAAGGATGAGAAAGAGAAGCAATAAAGGAAAAGGCTCTGAAAGCAGTGAAGGATCAGGCAACACT	245
55	G V D T G K D E K E K S N K G K G S E S S E G S G N T	81
246	AGCCGTGGAACAGAGAATCAGTCAATGAGAGACAAGGATGTGAATGCTGGTCAAGAGGAAAGGTTGTTCTCGGCTTCAG	326
82	S R G T E N Q S M R D K D V N A G S R G K V V P R L Q	108
327	AAGATCACAAAGAAAATGAATTTGCAATGGTGAAGGGGAATGTGATCTTGAATTTGGACCATCTGTTAGATTACAAGCCA	407
109	K I T K K M N L P M V K G N V I L M L D H L L D Y K P	135
408	GAGCAAACTGATCTTTTCAACACAAGAGCAACAAAGATGCAGTTTGAGATGTGGTACAATGCTGTGAAGGGCGAGTATGAG	488
136	E Q T D L F N T R A T K M Q F E M W Y M A V K G E Y E	162
489	ATAAATGATGAACAGATGTCAATTGTGATGAATGGCTTTATGGTGTGGTGTATTGACAATGGCACTTCACCAGATGTGAAT	569
163	I N D E Q M S I V M N G F M V M C I D N G T S P D V M	189
570	GGAACATGGGTGATGATGGATGGAGATGAGCAAGTGAATATCCTCTCAAACCAATGGTTGAGAATGCAAAACCAACACTT	650
190	G T W V M M D G D E Q V E Y P L X P M V E N A K P T L	216
651	CGGCAATCATGCACCATTTCTCAGATGCAGCTGAAGCATATATTGAGATGAGAAATTCGGAACGACCGTACATGCCTAGG	731
217	R Q I M H H F S D A A E A Y I E M R N S E R P Y M P R	243
732	TACGGATTGCTTCGGAATTTGAGGGACAAAAATTTAGCTCGCTACGCTTTGACTTCTATGAAGTAACCTCTAAGACATCA	812
244	Y G L L R N L R D K N L A R Y A F D F Y E V T S K T S	270
813	GATCGTGCAAGGGAAGCAGTAGCACAGATGAAGGCAGCAGCCCTCAGCAATGTAAACAGCAAGTTGTTTGGACTTGATGGG	893
271	D R A R E A V A Q M K A A A L S W V N S K L F G L D G	297
894	AATGTGGCAACAACCGAGAGATACTGAAAGGCACACTGCAAGGGACGTCAATCAGAACATGCATACACTTCTTGGCATG	974
298	N V A T T S E N T E R H T A R D V N Q N M H T L L G M	324
975	GGTCTGCGCAGTAGAGATTGGGTCAACTGATCACAGTTAGAATCTCGCGTCGCTAAATAATTTATATAGTAGTCTTTTA	1055
325	G S A Q *	330
1056	TGTTCTCTTAGTTTCAAGTGTGGTTTTACCACCATTTGCTAACTATTGTGATAGTGTGGTTGGTCCACCAACATATTGTGA	1136
330		330
1137	GTACTTTATGTTTATGAGTAAGCCGGAAGAACCATTGCAA	1176
330		330

ภาพที่ 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA สังเคราะห์จาก RNA ของเชื้อ PSIV-SN จำนวน 1,176 นิวคลีโอไทด์ (GenBank , accession number AF191748) และลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสแสดงไว้ในบรรทัดล่างต่อจากลำดับนิวคลีโอไทด์

/ แสดงตำแหน่งที่เป็น putative cleavage site สำหรับโปรตีนห่อหุ้ม

* แสดงจุดหยุด (translation stop codon)

กรดอะมิโนที่ขีดเส้นใต้ แสดงตำแหน่งของ motif ที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดไวรัสโดยเพื่อย่อน

2.2 การโคลนยีน replicase ของเชื้อ PSIV-SN

ก. การใช้ degenerate primer

จากการ สืบค้นเอกสารทำให้ได้ข้อมูลใหม่เกี่ยวกับ degenerate primers สำหรับโคลนยีนที่จำเพาะกับส่วนปลาย 3' ของจีโนมไวรัสชนิดต่างๆ ในวงศ์ Potyviridae (Potyvirid primers) ด้วยเทคนิค RT-PCR และกอบปรักกับความต้องการทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของส่วน 3' NCR เพื่อประโยชน์ในการจัดจำแนกเชื้อ PSIV-SN นอกเหนือจากการให้ได้โคลนตัวแทนของยีน replicase เพื่อนำมาศึกษา ลำดับนิวคลีโอไทด์ จึงได้โคลนยีนของ PSIV-SN อีกครั้งหนึ่งด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้primers ดังกล่าว ซึ่งประสบผลสำเร็จสามารถทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนปลาย 3' ของจีโนม PSIV-SN จำนวน 1,765 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วยยีนต่างๆ ดังนี้ คือ บางส่วนของยีน replicase (634 นิวคลีโอไทด์), ยีนโปรตีนห่อหุ้ม (861 นิวคลีโอไทด์) และส่วน 3' non-coding region จำนวน 253 นิวคลีโอไทด์ ต่อท้ายด้วย poly A-tail (17 นิวคลีโอไทด์) ต่อมาได้ออกแบบ primers จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบแล้วจากเชื้อ PSIV-SN (Nib-RV primer) และจากเชื้อไวรัสที่ใกล้เคียงกับ PSIV-SN (Nib-FW primer) สำหรับโคลนยีน replicase ในส่วนที่ยังไม่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค RT-PCR อีกครั้งหนึ่ง ผลที่ได้รับนอกจากทำให้ทราบข้อมูลของยีน replicase ที่สมบูรณ์ แล้วยังทราบบางส่วนของยีน nuclear inclusion proteins a (Nia)

มีขั้นตอนการทดลองดังต่อไปนี้

วิธีทดลอง

ก. การใช้ Potyvirid primers

- สังเคราะห์ primers ที่ออกแบบมาสำหรับการโคลนยีนในส่วน 3' terminal genome ของไวรัสในวงศ์ Potyviridae ที่รายงานโดย Gibbs and Mackenzie (1997) ตามลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังต่อไปนี้

Primer: Potyvirid 1 5' CAC GGA TCC CGG G(T)17 VGC 3'

Primer: Potyvirid 2 5' ACC ACA GGA TCC GGB AAY AAY AGY GGD CAR CC 3'

- การสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณ cDNA

1) ปฏิบัติการสังเคราะห์ first strand - cDNA

ผสมส่วนต่างๆ ต่อไปนี้ด้วยกัน คือ สารละลาย genomic RNA ที่สกัดจากอนุภาคไวรัสบริสุทธิ์ (1 µg/ µl) ตามวิธีข้างต้น จำนวน 2 µl, Potyvirid1 primer (50 pmole) 4 µl และ DEPC-treated water 9 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70°C นาน 10 นาที แล้ววางหลอดบนน้ำแข็งทันที

เติม RT-PCR reaction mix (5 x RT-buffer 8 μ l, Rnasin inhibitor 0.5 μ l, dNTPs mix (2.5 mM each) 4 μ l, Spermidine (10 mM) 0.5 μ l และ RAV-2RT (TAKARA) 0.5 μ l) ในขณะที่วางบนน้ำแข็ง ผสมให้เข้ากันดี แล้ววางหลอดไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42^oซ. นาน 90 นาที ได้เป็น cDNA สำหรับนำไปทำปฏิกิริยา PCR ต่อไป

2) ปฏิกิริยา PCR

ในสารละลายปฏิกิริยาปริมาณ 100 μ l ประกอบด้วย 10 x Taq DNA polymerase buffer (TAKARA) 10 μ l, MgCl₂ (25 mM) 4 μ l, dNTPs mix (2.5 mM each) 8 μ l, Potyvirid 1 (50 pmole) 1 μ l, Potyvirid 2 primer (50 pmole) 2 μ l, cDNA solution 5 μ l, และ distilled water 70 μ l จากนั้นเติม Taq DNA polymerase (TAKARA) 0.5 μ l ผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปใส่ในเครื่อง Thermal Cycler (TAKARA) โดยกำหนดโปรแกรมดังนี้ step 1 : อุณหภูมิ 94^oซ. 2 นาที จำนวน 1 รอบ; step 2 : อุณหภูมิ 94^oซ. 1 นาที, 60^oซ. 2 นาที และ 72^oซ. 3 นาที ทำซ้ำทั้งหมด 35 รอบ; step 3 : อุณหภูมิ 72^oซ. 8 นาที จำนวน 1 รอบ จึงสิ้นสุดปฏิกิริยา

ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอใน 2% agarose gel, 1 x TAE buffer เปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน ย้อมเจลดด้วยสารละลาย ethidium bromide ตรวจสอบแถบของดีเอ็นเอโดยใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต จาก UV transilluminator

การโคลน cDNA

เชื่อมต่อดีเอ็นเอขนาด 0.8 และ 1.7 kb ที่แยกได้จากเจล เข้ากับพาหะ pGEM-T easy (Promega) โดยการทำงานของเอนไซม์ T4 DNA ligase ที่อุณหภูมิ 4^oซ. นาน 16 ชั่วโมง ส่งถ่ายโมเลกุลดีเอ็นเอสายผสมเข้าในเซลล์ของ *E. coli* JM 109 โดยใช้เครื่องมือ Gene Pulser (Bio Rad) คัดเลือกโคลนบนอาหาร LB ที่เติมแอมพิซิซิน IPTG และ X-gal โดยเลือกมาเฉพาะโคโลนีสีขาวขุ่น

วิเคราะห์พลาสมิดโดยการแยกสกัดพลาสมิดเช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น และคัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* แยกขนาดดีเอ็นเอบน 0.8 % agarose gel ย้อมสีและตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วย UV transilluminator

แบ่งกลุ่มของโคลนที่มีส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้มของเชื้อ PstV-SN โดยวิธี Southern blot hybridization โดยใช้ NC28 DNA probe ทำปฏิกิริยา hybridization กับ DNA จากโคลนต่างๆ ในภาพที่ 18 ที่ย้ายลงไปบน nylon membrane ตามวิธีการ Southern transfer ของ Sambrook *et al.* (1987) ไฮบริไดซ์ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 42^oซ. แล้วล้าง NC28 probe ส่วนเกินออกด้วย Wash buffer 1 (0.5 X SSC + 0.4% SDS) 2 x 10 นาที ที่ 55^oซ. และ Wash buffer 2 (2 x SSC) 2 x 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบการเกิดไฮบริดเซชันบนแผ่น nylon หลังจากเติมสารละลาย substrates โดยใช้แผ่นฟิล์มเอกซ์เรย์รับสัญญาณ

ตรวจหาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ inserted cDNA จากโคลนทั้งที่เป็นตัวแทนในกลุ่มไฮบริโดส์ และไม่ไฮบริโดส์กับ NC 28 DNA probe

ผลการทดลอง

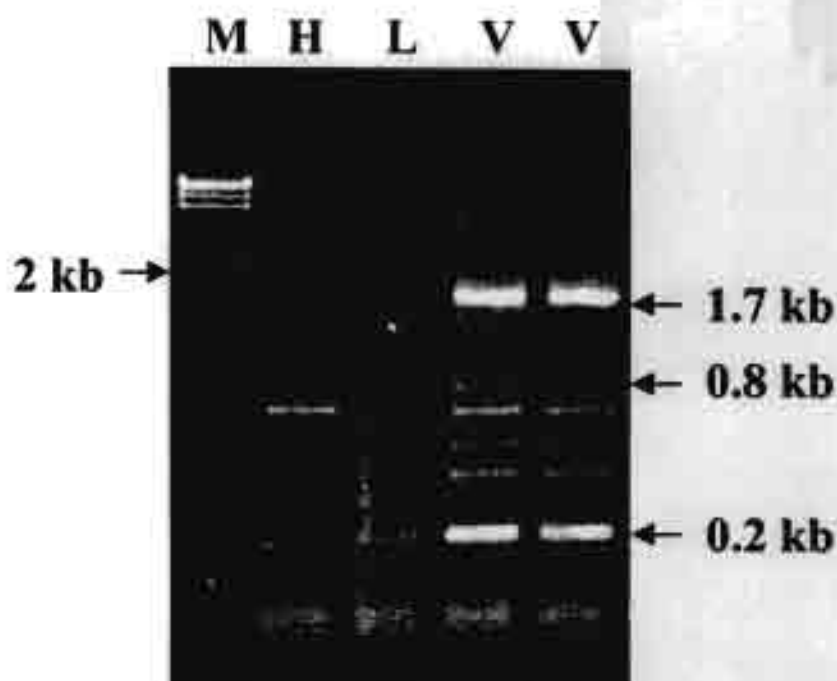
จาก RT-PCR products ตรวจพบดีเอ็นเอขนาดต่างๆ จำนวน 6 ขนาด ตั้งแต่ 0.20 - 1.7 kb เมื่อใช้ genomic RNA ของไวรัสเป็นต้นแบบในสังเคราะห์ first strand cDNA (ภาพที่ 17)

เมื่อโคลนดีเอ็นเอขนาดขนาด 1.7 และ 0.8 kb ในพาหะ pGEM-T easy ได้โคลนสีขาวจำนวนมาก จากโคลนที่คัดเลือกไว้ 150 โคลน สกัดพลาสมิดและวิเคราะห์หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมจำนวน 50 โคลน พบว่าทั้งหมดเป็น recombinant clones โดยส่วนใหญ่มี inserted cDNA ขนาดตั้งแต่ 200 ถึง 800 bp และมีเพียง 3 โคลนที่มี inserted DNA ขนาดใหญ่ประมาณ 1.7 kb แต่มีปัญหาในการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ทำให้ไม่สามารถแยกส่วนของ insert cDNA ออกจากส่วนของ vector DNA ได้ (ภาพที่ 18ก., 19ก.)

ผลการจัดกลุ่มโคลนด้วย NC28 DNA probe พบว่าโคลนที่มี inserted cDNA ขนาดใหญ่ประมาณ 1.7 kb และให้สัญญาณไฮบริโดส์อย่างชัดเจนกับ NC 28 DNA probe มีทั้งหมด 3 โคลน คือ pGTEN-6, pGTEN-8, และ pGTEN-36 ส่วนโคลนอื่นๆ มี insert cDNA ขนาดเล็ก ไม่พบสัญญาณไฮบริโดส์กับ NC28 DNA probe ยกเว้นโคลน pGTEN-15 และ pGTEN-31 (ภาพที่ 18ข., 19 ข.) ที่พบสัญญาณไฮบริโดส์เช่นกัน

เลือกโคลนเป็นตัวแทนสำหรับหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวน 10 โคลน แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

- ก.) โคลนที่ไฮบริโดส์กับ NC 28 probe ได้แก่ pGTEN-6 (1.7 kb), pGTEN-8 (1.7 kb), pGTEN-15 (ประมาณ 850 bp), pGTEN-31 (ประมาณ 850 bp) และ pGTEN-36 (1.7 kb) โดยคาดว่าจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนหนึ่งเหลื่อม (overlap) หรือ ซ้อนทับ (cover) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ NC28 DNA probe
- ข.) โคลนที่ไม่เกิดสัญญาณไฮบริโดส์กับ NC28 probe ได้แก่ pGTEN-1 (700 bp), pGTEN14 (ประมาณ 450 bp), pGTEN-18 (ประมาณ 250 bp), pGTEN-25(ประมาณ 700 bp), pGTEN-43 (ประมาณ 700 bp) คาดว่าเป็นโคลนที่มีเฉพาะส่วนของยีน replicase หรือมีส่วนยีนโปรตีนห่อหุ้มในส่วนที่นอกเหนือจากบริเวณที่เกิด complementary กับ NC28 probe



ภาพที่ 17 แสดงขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RT-PCR โดยใช้ Potyvirus 1 / Potyvirus 2 primers และ template RNA จากแหล่งต่างๆ สำหรับสังเคราะห์ first strand cDNA แยกบน 2 % agarose gel, 1X TAE buffer

M = λ DNA / HindIII markers

H = total nucleic acids จากใบถั่วลิสงปกติ

L = total nucleic acids จากใบถั่วลิสงเป็นโรคจากเชื้อ PSIV-SN

V = genomic RNA จากอนุภาคของเชื้อ PSIV-SN

ก.



ข.



ภาพที่ 18 แสดงโคลน pGTEN ต่างๆ ที่ได้จากการนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 0.8 -1.7 kb เข้าไปในพาหะ pGEM-T easy (Promega)

ก. = รูปแบบพลาสมิดดีเอ็นเอหลังจากการย่อยด้วยเอนไซม์ *EcoRI*;

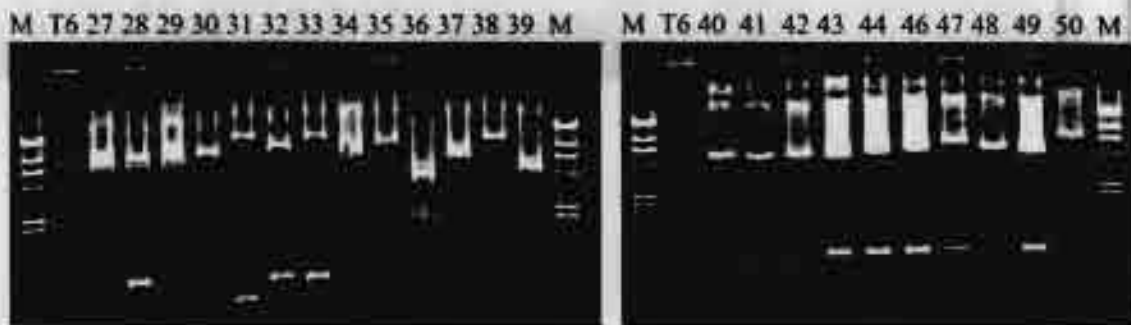
ข. = ผลการทำไฮบริไดเซชันของดีเอ็นเอจากโคลนที่อยู่ในภาพ ก. กับ NC28 probe .

ตัวเลข = หมายเลขของโคลน pGTEN-;

M = λ DNA/*HindIII* ;

T6 = uncut pGT-T6(1) ซึ่งมีส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้มของเชื้อ PSIV-T6/97 strain

ก.



ข.



ภาพที่ 19. โคลน pGTEN ต่างๆ ที่ได้รับจากการนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 0.8 - 1.7 kb เข้าไปในพาหะ pGEM-T easy (Promega) เมื่อคัดเลือกโดยวิธีการต่างๆ

ก. = รูปแบบพลาสมิดดีเอ็นเอหลังจากการย่อยด้วยเอนไซม์ *EcoRI*;

ข. = ผลการทำไฮบริไดเซชันของดีเอ็นเอจากโคลนที่อยู่ในภาพ ก. กับ NC28 probe ,

ตัวเลข = หมายเลขของโคลน pGTEN-;

M = λ DNA/*HindIII* ;

T6 = uncut pGT --T6(1) ซึ่งมีส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้มของเชื้อ PSIV-T6/97 strain

ผลการตรวจหาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

พบว่า โคลนขนาดใหญ่ที่ไฮบริไดซ์กับ NC28 DNA probe คือ pGTEN-6, pGTEN-8, และ pGTEN-36 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน เมื่อทำการ alignment และ connection ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้รับทั้งหมดกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบแล้วก่อนหน้านี้ ทำให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ insert cDNA ทั้งหมดเท่ากับ 1,765 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 20) ซึ่งประกอบด้วยส่วนต่างๆ เรียงตามลำดับดังนี้ คือ

ยีน replicase บางส่วน (634 นิวคลีโอไทด์),

ยีนโปรตีนห่อหุ้ม (861 นิวคลีโอไทด์) ,

3' non-coding region (253 นิวคลีโอไทด์), และ

poly A-tail (17 นิวคลีโอไทด์)

(GenBank accession number AF 200632)

DNASIS Translation Editor	
2 GGTAAATACAGTGGTCAGCCTTCCACAGTCGTGGACACACACTCATGGTTGTTATGTCAGTGTATTATTCATGTCACAAA	82
1 G H N S G Q P S T V V D H T L M V V N S V Y Y S C H K	27
83 GTGGGTGGAGTGATGAAGACATCCAGGAGCGTTGGTTTTCTTGCCAATGGGGATGACATCATACTTTCTGTGCAAGAG	163
28 V G W S D E D I Q E R L V F F A N G D D I I L S V Q E	54
164 ACGGATCTCTGGGTCTTGACACATTTACCAAAATCATTTGGAGAACTTGGCCTGAATTATGACTTCAGTGAGAGAACAGA	244
55 T D L R V L D T F T X S F G E L G L M Y D F S E R T R	81
245 AAGAGGGAGATCTCTGGTTCATGTCACACTGTGCGATTCAAGTTGATGGATATATATTCAAAATTAGAACAGAGCGT	325
82 K R E D L N F N S H C A I Q V D G I Y I P K L E P E R	108
326 GTTGTTCCTAGAGTGGGATAGGAGCAAGAAATGATGCACAGGACTGAAGCAATCTGTGCAGCAATGATTGAAGCA	406
109 V V S I L E M D R S K E M M H R T E A I C A A N I E A	135
407 TGGGGCTATCCTGAATTGCTCAAGAAATTAGAAAATTTTATTTGTGGTTGCTTGAGAGGGAGGAGCTCAGAGAGATTGCA	487
136 W G Y P E L L Q E I R K F Y L N L L E R D E L R E I A	162
488 GCCAGTGGAGGAGCTCCATACATAGCAGAAATCAGCACTCAAAACACTTTACACCAACAAAGAACAAAGAAATTGAAGATTG	568
163 A S G G A P Y I A E S A L K T L Y T H K R T R I E E L	189
569 GCAAGTATTTGGCGCTGCTGATTTTATTATGAAGTTGGATGGAGAACTGTGCATCTACAATCAGGGAGCAGCACA	648
190 A K Y L A V L D F D Y E V G C G E S V H L Q / S G S S T	216
650 CAACCACCACTGGTGGATGCTGGCGTGGATCTGGCAAGGATAAGAAAGAGAAGAGCAATAAAGGAAAAGGCTCTGAAAGT	738
217 Q P P V V D A G V D T G K D K K E K S N K G K G S E S	243
731 AGTGAGGATCAGGCAACACTAGCGGTGGAAACAGAGAAATCAGTCAATGAGAGACAAGGATGTAATGCTGGTTCAAGAGGA	811
244 S E G S G N T S R G T E N Q S N R D K D V N A G S R G	278
812 AAGGTTGTTCTCGGCTTCAGAGATCACAAGAAAATGAATTTGCCAATGGTGAAGGGGAATGTGATCTTGAATTTGGAC	892
271 X V V P R L Q K I T K K N H L P N V K G N V I L N L D	297
893 CATCTGTTAGATTACAAGCCAGAGCAAACTGATCTTTCAACACAAGAGCAACAAAGATGCAGTTTGAGATGTGGTACAAT	973
298 H L L D Y K P E Q T D L F H T R A T K M Q F E M N Y M	324
974 GCTGTGAAGGGCGAGTATGAGATAAATGATGAACAGATGTCAATTTGATGAATGGCTTTATGGTGTGGTGTATTGACAAT	1054
325 A V K G E Y E I N D E Q M S I V M N G F N V N C I D M	351
1055 GGCACCTTCACCAGATGTGAATGGAACATGGGTGATGATGGATGGAGATGAGCAAGTGGAAATCCTCTCAAAACCAATGGTT	1135
352 G T S P D V N G T M V M N D G D E Q V E Y P L K P M V	378
1136 GAGAATGCAAAACCAACACTTCGGCAATCATGCACATTCTCAGATGCAGCTGAAGCATATATTGAGATGAGAAATTC	1216
379 E N A K P T L R Q I M H F S D A A E A Y I E M R N S	405
1217 GAACGACGTACATGCCTAGGTACGGATTGCTTCGGAATTTGAGGGACAAAAATTTAGCTCGCTACGCTTTCGACTTCTAT	1297
406 E R P Y N P R Y G L L R H L R D K N L A R Y A F D F Y	432
1298 GAAGTARCTCTAAGACATCAGATCTGCAAGGGAGAGCAGTACACAGATGAAGGCAGCAGCCCTCAGCAATGTTAACAGC	1378
433 E V T S K T S D R A R E A V A Q N K A A A L S N V N S	459
1379 AAGTTGTTTGGACTTGATGGGAATGTGGCAACACAGCAGAGAATACTGAAGGGAACACTGCAAGGGAGCTCAATCAGAAC	1459
460 K L F G L D G N V A T T S E N T E R H T A R D V M Q H	486
1460 ATGCATACACTTCTGGCATGGTTCTGCGCAGTAGAGATTGGGTCAACTGATCACAGTTAGAATCTCGCGTCGCTAAATA	1540
487 M H T L L G N G S A Q *	499
1541 ATTTTCATATAGTAGTCTTTTATGTTCTCTTATGTTTCACTGTGGTTTTACCACCAATGTCTAACTATTGTGATAGTGTGGT	1621
499	499
1622 TGGTCACCAACATATTGTGAGTACTTTATGTTTATAAGTAAGCCGGAAGAACCATTCGAATGGTGAGGACGTGCAGAGTG	1702
499	499
1703 ATTCTATCAGGTGTATGGGTAGCTACGGCAATGCTTGTGTGCCAAAAA	1765
499	499

ภาพที่ 20 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ทางด้านปลาย 3'-terminal ของจีโนมของเชื้อ peanut stripe virus-severe necrotic strain 1,765 นิวคลีโอไทด์ (GenBank AF 200632) โดยมีนิวคลีโอไทด์แรกคือ G แต่ไม่ได้แสดงไว้เนื่องจากการแปลรหัสโปรตีนที่ถูกต้องอยู่ใน ORF 2 แนวล่างเป็นลำดับกรดอะมิโน มี GDD motif ของ replicase, Q/S = cleavage site ของโปรตีนห่อหุ้ม, DAG motif ของโปรตีนห่อหุ้มและส่วน 3' non-coding region ที่ไม่มีการแปลรหัสเป็นโปรตีน

ข. การใช้ designed primers ที่จำเพาะกับยีน Nla/Nib

เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบแล้วทั้งหมดมีส่วนยีน replicase เพียง 634 นิวคลีโอไทด์ ที่อยู่ส่วนปลาย 3' ของยีน จึงได้โคลนยีน replicase ส่วนที่เหลืออีกครั้งหนึ่งโดยเทคนิค RT-PCR ใช้ primers ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PSIV-SN และโพทิไวรัสชนิดอื่นๆ ที่มีความใกล้เคียงกันกับเชื้อ PSIV-SN ทำให้ได้คัดเอนเอขนาดประมาณ 1.2 kb สำหรับนำไปโคลน เมื่อตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากโคลนที่คัดเลือกไว้ พบว่าเป็นส่วนของยีน replicase โดยมีส่วนที่ซ้อนทับกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน replicase ที่ทราบก่อนแล้ว เมื่อสิ้นสุดการทำ alignment และ connection ทำให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน replicase ของเชื้อ PSIV-SN อย่างสมบูรณ์ จำนวน 1,548 นิวคลีโอไทด์ และได้ทราบบางส่วนของยีน Nla อีกจำนวน 114 นิวคลีโอไทด์

มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

วิธีทดลอง

- ออกแบบและสังเคราะห์ primers

ออกแบบ และสังเคราะห์ primers ที่complementary กับ "GDD" motif ของ PSIV-SN คือ Nib-RV จำนวน 20 mer และ forward primer (Nib-FW) ที่จำเพาะกับส่วนปลาย 3' ของยีน Nla ที่ต่อเนื่องกับส่วนของยีน replicase ของเชื้อ PSIV-blotch (GenBank accession number U05771) จำนวน 20 mer โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังต่อไปนี้

Nib-RV: 5' GTA TGA TGT CAT CCC CAT TG 3'

Nib-FW: 5' CAA CCC GAC AAA ATA GCT TG 3'

- การเตรียม RNA template

แยกสกัด genomic RNA จากอนุภาคไวรัสบริสุทธิ์ตามกรรมวิธีที่ได้กล่าวในเบื้องต้น

- การสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณ cDNA

1) ปฏิบัติการสังเคราะห์ first strand cDNA

ผสมส่วนต่างๆ ต่อไปนี้ด้วยกัน คือ PSIV-SN RNA (0.68 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 3 μl , Nib-RV primer (80 pmole) 3 μl และ DEPC-treated water 8 μl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70°C นาน 10 นาที แล้ววางหลอดบนน้ำแข็งทันที เติม RT-PCR reaction mix (5 x RT-buffer 8 μl , Rnasin inhibitor 1 μl , dNTPs mix (2.5 mM each) 4 μl , Spermidine (10 mM) 0.5 μl . DEPC-treated water 25.5 μl และ M-MLV-reverse transcriptase 1 μl ผสมให้เข้ากันดี แล้ววางหลอดไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25°C)

นาน 2 นาที จึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 °C นาน 90 นาที นำหลอดปฏิกิริยามาวางบนน้ำแข็ง ได้เป็นสารละลาย first strand cDNA สำหรับนำไปทำปฏิกิริยา PCR ต่อไป

2) ปฏิกิริยา PCR

ในสารละลายปฏิกิริยา PCR ปริมาณ 100 μ l ประกอบด้วย 10 x Taq DNA polymerase buffer 10 μ l, $MgCl_2$ (25 mM) 4 μ l, dNTPs mix (2.5 mM each) 8 μ l, Nib-RV (80 pmol) 1 μ l, Nib-FW (50 pmole) 2 μ l, first strand cDNA solution 5 μ l, และ distilled water 65 μ l จากนั้นเติม Taq DNA polymerase 1 μ l ผสมให้เข้ากันดี แล้วปิดทับด้วย mineral oil หลอดละ 100 μ l นำไปใส่ในเครื่อง Thermal Cycler (HYBAID) โดยกำหนดโปรแกรมดังนี้ step 1 : อุณหภูมิ 94 °C 2 นาที จำนวน 1 รอบ; step 2 : อุณหภูมิ 94 °C 2 นาที, 55 °C 1 นาที และ 72 °C 2 นาที ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ; step 3 : อุณหภูมิ 72 °C 8 นาที จำนวน 1 รอบ จึงสิ้นสุดปฏิกิริยา

ตรวจสอบดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาใน 1.2% agarose gel, 1/2 x TBE buffer ที่ 50 volts (MUPID gel, BIORAD) เปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน ย้อมสีและตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วย UV Transilluminator

- การโคลน cDNA

แยกดีเอ็นเอขนาด 1.2 kb ที่ได้จาก RT-PCR product ออกจากเจล แล้วเชื่อมต่อเข้ากับพาหะ pGEM-T easy (Promega) ส่งถ่ายโมเลกุลสายผสม (recombinant DNA) เข้าในเซลล์ของ *E. coli* JM 109 โดยวิธี heat-shock (Sambrook *et al.*, 1989) คัดเลือกโคลนบนอาหาร LB ที่เติมแอมพิซิลิน, IPTG และ X-gal เลือกมาเฉพาะโคโลนีสีขาวขุ่น แยกสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอและตรวจสอบโดย agarose electrophoresis และวิเคราะห์ขนาดของ inserted cDNA โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *BstZI*

- การตรวจหาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

เตรียมดีเอ็นเอต้นแบบจากโคลนที่คัดเลือกไว้ (SN-Nib#2 และ SN-Nib#3) โดยใช้ DNA purification kit ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ตามวิธีการที่ใช้สำหรับเครื่อง Automated DNA sequencer โดยใช้ทั้ง general M13 forward and reverse sequencing primers และ designed sequencing primers

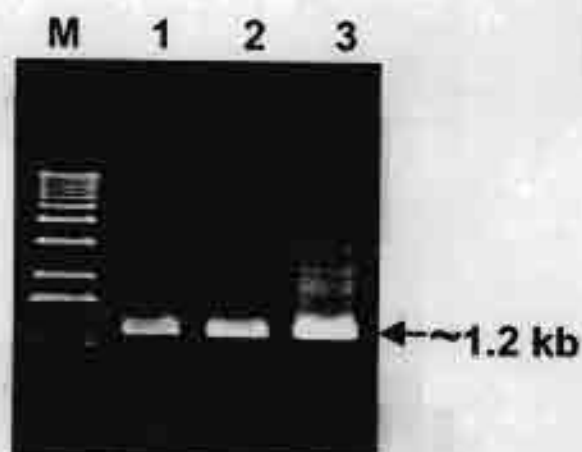
ผลการทดลอง

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา RT-PCR พบว่าได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.2 kb ตรงตามที่คาดหมายไว้ (ภาพที่ 21 ก.) แยกแถบดีเอ็นเอนี้ออกจากเจลตามกรรมวิธีที่ได้กล่าวข้างต้นแล้วโคลนเข้าในพาหะ

pGEM-T easy คัดเลือก recombinant clones จากโคลนที่คัดเลือกไว้ 68 โคลน เมื่อสกัดพลาสมิด และวิเคราะห์หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ *Bst*/ZI พบว่าโคลนส่วนใหญ่มี insert DNA ขนาดประมาณ 1.2 kb และ ในส่วนของ inserted DNA มีตำแหน่งของ *Eco*RI อีกหนึ่งตำแหน่ง จึงทำให้ได้ดีเอ็นเอ 3 ขนาด ปรากฏบนเจล (ภาพที่ 21 ข.)

เมื่อนำโคลน SN-Nib#2 และ SN-Nib#3 ไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ทำให้ทราบว่าทั้งสอง โคลนมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PSIV-SN cDNA เหมือนกัน จำนวน 1,177 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 22) โดยลำดับด้านปลาย 3' จำนวน 147 นิวคลีโอไทด์ ซ้อนทับกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน replicase ใน ส่วนที่ทราบก่อนแล้วตรงตามที่คาดหมายไว้ เมื่อแปลรหัสนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับกรดอะมิโน พบว่ามี long ORF ใน frame 1 ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 392 เรสิดิวซ์ มี putative cleavage site สำหรับโปรตีน Nib เป็น Q/S ที่ตำแหน่ง 120/ 121

ก.



ข.



ภาพที่ 21

การโคลนนิ่ง replicase ของเชื้อ PSIV-SN โดยใช้ Nib-RV และ Nib-FW primers และ RNA ของเชื้อ PSIV-SN เป็นต้นแบบ

ก. ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RT-PCR แยกบน 2 % agarose gel, $\frac{1}{2}$ X TBE buffer; M = 1 kb DNA ladder

ข. รูปแบบของพลาสมิดจากโคลน SN-Nib#2 และ SN-Nib#3 ในสภาพ uncut และตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* (2E, 3E) และ *BstZI* (2B, 3B)
M = λ -DNA/ *Hind III* markers, vector DNA = pGEM-T easy (Promega), insert cDNA = RT-PCR product (ภาพที่ 21 ก)

DNASIS Translation Editor [NIB#3]

1	CAACCCGACAAATAGCTTGGGGTTCATTGAATCTTGTAGTGATCAGCTAAAAGAAGAATTCAAAGTTTCAAACTTATC	81
1	Q P D K I A W G S L N L V S D Q L K E E F K V S K L I	27
82	TCAGATCTTTTGGTGGCACAGTGGCAACACAGAGCAAGCAGCAGTGGGTTTTGGAGTCCGCTGAAGGCAATCTAAAGGCA	162
28	S D L F G G T V A T Q S K Q Q W V L E S A E G N L K A	54
163	TGCGCAAGAGCTGACAGCGCATTGGTAACAAAGCATGTTGTGAAGGGCAAGTGTCCATACTTTGAGCAGTACTTGAGAGAG	243
55	C A R A D S A L V T K H V V X G K C P Y F E Q Y L R E	81
244	CGAGTGAAGCAGCTGCATTCTTCAAGCCTTTGATGGGTGCATACCAACCAAGCAAACTTAACAAGGAAGCATTAAAGAAA	324
82	R S E A A A F F K P L N G A Y Q P S K L N K E A F K K	188
325	GACTTCTTCAATACAACAAAGTTGTAATACTGAATGAAGTTTGCATGAAGCGTTGAAGCAGCTTCAATGGTGTGTG	405
109	D F F K Y N K V V I L N E V C H E A F E A A F N G V V	135
406	AGGATGATGATGGAGCAGGTTTTCTGAGTGCTCTTATGTAACAGACCCAGATGAAATATACTCATTCATTGAACCTGAAG	486
136	R M M M E H G F S E C S Y V T D P D E I Y S S L M L K	162
487	GCAGCAGTTGGAGCACAATACAAAGGGAAAAAGCAGGACTATCTTTGTGATATGGATGAATTCAACAAGGAAAAGCTTTTG	567
163	A A Y G A Q Y K G K K Q D Y L C D M D E F N K E R L L	189
568	TACCTGAGTTGTGAGAGATTGTTCTATGGCAAGAAAGGGCTTTGGAATGGTCTTTGAAGGCAGAGTTGAGGCCATTAGAG	648
190	Y L S C E R L F Y G K K G L N M G S L K A E L R P L E	216
649	AAGGTTGAGGCTAACAAAACAGTACCTTCACAGCTGCTCCATTGATACATTACTTGGAGCAAAGGTTGTGTGGATGAT	729
217	K V E A N K T R T F T A A P I D T L L G A K V C V D D	243
730	TTCAACAACCAATTTTATAGTCTCAACTTGAATGCCATGGACTGTAGGGATGACAAAATTCTATGGAGGATGGGACACC	810
244	F M H Q F Y S L N L E C P W T V G M T K F Y G G W D T	270
811	CTAATGAGAAAGTTGCCTGATGGGTGGATTTATTGTGATGCAGATGGTTCACAATTTGATAGTTGTTAAACCACTCCTC	891
271	L M R K L P D G W I Y C H A D G S Q F D S S L T P L L	297
892	CTCAACTCAGTCCTTGGGATCAGAAGATTCTTCATGGAGGATTGGTGGGTTGGTGAAGAGATGCTTGAAAATCTGTATGCT	972
298	L N S V L G I R R F F M E D W N V G E E M L E N L Y A	324
973	GAGATTGTGTACACACCTATACTAACACCAGATGGAACAGTGTTAAAAAGTTGAGGGGAAACAACAGTGGACAACCTTCC	1053
325	E I V Y T P I L T P D G T V F K K F R G H N S G Q P S	351
1054	ACAGTCGTGGACAACACACTCATGGTTGTTATGTGAGTGATTATTATCATGTCAAAAGTGGGCTGGAGTGATGAAGACATC	1134
352	T V V D N T L M V V M S V Y Y S C H K V G W S D E D I	378
1135	CAGGAGCGCTTGGTTTTCTTGGCAATGGGGATGACATCATAC	1177
379	Q E R L V F F A M G D D I I	393

ภาพที่ 22

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PSIV-SN cDNA จากโคลน SN-Nib#2 และ SN-Nib#3
จำนวน 1,177 นิวคลีโอไทด์

แถวล่าง (1-393) เป็นลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอ
ไทด์ในแถวบนด้วยโปรแกรม DNASIS

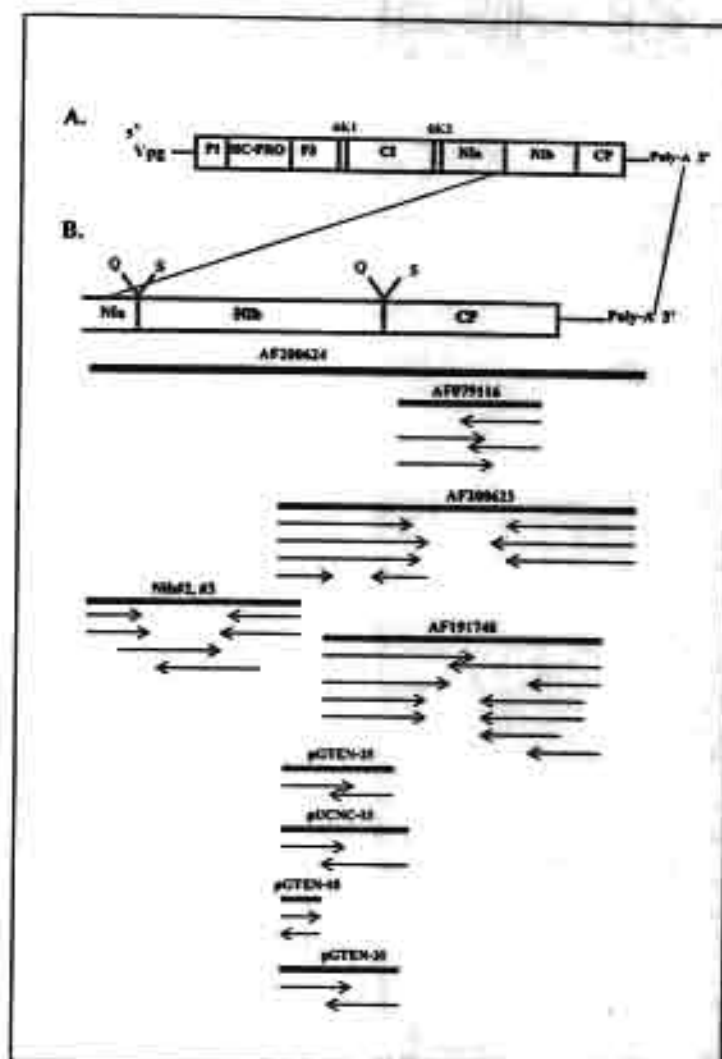
ขีดเส้นใต้ เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Nib-forward primers และ
complementary ของ Nib reverse primer ตามลำดับ

2.3 สรุปผลการโคลนนิ่งของเชื้อ PSIV-SN

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบในแต่ละขั้นตอน(2.1.2.2)ของการโคลนนิ่งมาเปรียบเทียบกับวิเคราะห์และเชื่อมต่อกัน (ภาพที่ 23) ทำให้ได้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนปลาย 3' ของจีโนมเชื้อ PSIV-SN ทั้งสิ้น 2,793 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 24) แปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนได้อย่างต่อเนื่องใน ORF 1 ได้จำนวนทั้งสิ้น 1,802 เรสิดิวซ์ โดยเป็นรหัสสำหรับการสร้างโปรตีนชนิดต่างๆ และส่วนที่เป็นบริเวณที่ไม่แปลรหัส (non-coding) ซึ่งอยู่ทางด้านปลาย 3' ของจีโนมไวรัส เรียงตามลำดับจากปลาย 5' ไป 3' ดังนี้

- 1) ส่วนหนึ่งของยีน *small nuclear inclusion proteinase (Nla gene)* จำนวน 114 นิวคลีโอไทด์ (เริ่มตั้งแต่ 1-114) แปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนได้จำนวน 38 เรสิดิวซ์
- 2) ยีน *replicase* หรือ *large nuclear inclusion protein (Nlb) gene* (เริ่มตั้งแต่ 115 -1,662) เป็นรหัสของการสังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการจำลองจีโนม (genome replication) จำนวน 1,548 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนได้จำนวน 561 เรสิดิวซ์ คำนวณเป็นน้ำหนักโมเลกุลได้ 59,336.76 คาลตัน โดยมี putative cleavage site (ด้านที่ต่อยีน Nla และ ด้านที่ต่อยีนโปรตีนห่อหุ้ม) เป็น glutamine / serine (Q/S)
- 3) ยีนโปรตีนห่อหุ้ม (CP gene) เป็นรหัสของการสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกของไวรัส (เริ่มตั้งแต่ 1,663 - 2,523) มีจำนวน 861 นิวคลีโอไทด์ (รวมทั้ง termination codon TAG) โดยอยู่ต่อจากยีน replicase ยีนโปรตีนห่อหุ้มแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนได้จำนวน 286 เรสิดิวซ์ มี putative cleavage site ทางด้าน 5'- คือ Q/S คำนวณน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน ได้ 32,035.35 คาลตัน
- 4) ส่วน 3' non-coding region (3' NCR) จำนวน 253 นิวคลีโอไทด์ (เริ่มตั้งแต่ 2,524 - 2,776) ไม่มีการแปลรหัสของการสังเคราะห์โปรตีน
- 5) poly-A tail จำนวน 17 นิวคลีโอไทด์ (เริ่มตั้งแต่ 2,778 - 2,793)

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดอยู่ใน GenBank accession number AF200634



ภาพที่ 23 แผนภาพทิศทางการโคลนนิ่ง และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน replicase และยีนโปรตีนห่อหุ้มเชื้อ peanut stripe virus-severe necrotic strain
A = แผนภาพแสดงการเรียงตัวของยีนต่างๆ บนจีโนมของ PSV
B = ภาพขยายส่วน 3' terminal ของจีโนม พร้อมรายละเอียดต่างๆ
เส้นทึบ หมายถึงชิ้นส่วน cDNA ที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วตามชื่อที่ระบุไว้
ด้านบนของเส้นทึบ
ลูกศร แสดงทิศทางของการทำ DNA sequencing

1	CAACCCGACAAATAGCTTGGGGTTCAATGAATCTTGTAGTGATCAGCTAAAAAGAAGATTCAAAGTTTCAAACTTATC	81
1	Q P D K I A W G S L N L V S D Q L K E E F K V S K L I	27
82	TCAGATCTTTTTGGTGGCAGTGGCAACACAGAGCAAGCAGCAGTGGGTTTTGGAGTCCGCTGAAGGCAATCTAAAGGCA	162
28	S D L F G G T V A T O S K Q Q W V L E S A E G N L K A	54
163	TGCGCAAGAGCTGACAGCGCATTGGTAACAAAGCATGTTGTGAAGGGCAAGTGTCCATACTTTGAGCAGTACTTGAGAGAG	243
55	C A R A D S A L V T K H V V K G K C P Y F E Q Y L R E	81
244	CGGAGTGAAGCAGCTGCATTCTTCAAGCCTTTGATGGGTGCATACCAACCAAGCAAACTTAACAAGGAAGCATTAAAGAAA	324
82	R S E A A A F F K P L M G A Y Q P S K L N K E A F K K	108
325	GACTTCTTCAAATACAAAGTTGTAATACTGAATGAAGTTTGCCATGAAGCGTTTGAAGCAGCTTCAATGGTGTGTG	405
109	D F F X Y N K V V I L N E V C H E A F E A A F N G V V	135
486	AGGATGATGATGGAGCAGCGTTTTCTGAGTGCTCTTATGTAACAGACCCAGATGAAATATACTCATCATTGAACCTGAAG	486
136	R M M M E H G F S E C S Y V T D P D E I Y S S L N L X	162
487	GCAGCAGTTGGAGCACAATACAAAGGGAAAAAGCAGGACTATCTTTGTGATATGGATGAATTCAACAAGGAAGACTTTTG	567
163	A A V G A Q Y K G K K Q D Y L C D M D E F N K E R L L	189
568	TACCTGAGTTGTGAGAGATTGTTCTATGGCAAGAAAGGGCTTGGAAATGGTTCTTTGAAGGAGAGTTGAGGCCATTAGAG	648
190	Y L S C E R L F Y G K K G L M N G S L K A E L R P L E	216
649	AAGGTTGAGGCTAACAAACACGTACCTTACAGCTGCTCCATTGATACATTACTTGGAGCAAAGGTTTGTGTGGATGAT	729
217	K V E A N K T R T F T A A P I D T L L G A K V C V D D	243
730	TTCAACAACCAATTTTATAGTCTCAACTTGGAAATGCCATGGACTGTAGGGATGACAAAATTCTATGGAGGATGGGACACC	810
244	F N N Q F Y S L N L E C P W T V G M T K F Y G G W D T	270
811	CTAATGAGAAAGTTGCCTGATGGGTGGATTATTGTGATGCAGATGGTTACAATTTGATAGTTGTTAACACCACTCCTC	891
271	L M R K L P D G M I Y C H A D G S Q F D S S L T P L L	297
892	CTCAACTCAGTCTTGGGATCAGAAGATTCTTCATGGAGGATTGGTGGGTTGGTGAAGAGATGCTTGAAATCTGTATGCT	972
298	L N S V L G I R R F F N E D W W V G E E N L E N L Y A	324
973	GAGATTGTGTACACACCTATACTAACACAGATGGAACAGTGTAAAAAGTTGAGGGGAAACAACAGTGGACAACTTCC	1053
325	E I V Y T P I L T P D G T V F K K F R G M N S G Q P S	351
1054	ACAGTCGTGGACAACACACTCATGGTTGTTATGTGAGTGTATTATTGATGTCAAAAGTGGGCTGGAGTGATGAAGACATC	1134
352	T V V D N T L M V V M S V Y Y S C H K V G W S D E D I	378
1135	CAGGAGCGCTTGGTTTTCTTGGCAATGGGGATGACATCATACTTTCTGTGCAAGAGACGGATCTCTGGGTCTTGACACA	1215
379	Q E R L V F F A N G D D I I L S V Q E T D L W V L D T	405
1216	TTTACCAATCATTTGGAGAACTTGGCCTGAATTATGACTTCAGTGAGAGAAACAAGAAAGAGGGAGATCTCTGGTTCATG	1296
406	F T K S F G E L G L N Y D F S E R T R K R E D L W F W	432
1297	TCACACTGTGCGATTCAAGTTGATGGAATATATATCCAAAATTAGAACCAGAGCGTGTGTTTCAATCCTAGAGTGGGAT	1377
433	S H C A I Q V D G I Y I P K L E P E R V V S I L E W D	459
1378	AGGAGCAAAGAAATGATGCACAGGACTGAAGCAATCTGTGCAGCAATGATTGAAGCATGGGGCTATCCTGAATTGCTCAA	1458
460	R S K E M M H R T E A I C A A M I E A W G Y P E L L Q	486
1459	GAAATTAGAAAATTTTATTTGTGGTTGCTTGAGAGGGACGAGCTCAGAGAGATTGCAGCCAGTGGAGGAGCTCCATACATA	1539
487	E I R K F Y L W L L E R D E L R E I A A S G G A P Y I	513
1540	GCAGAATCAGCACTCAAAACACTTTACACCAACAAAGGAACAAGAATTGAAGAGTTGGCAAAGTATTTGGCCGTGCTTGAT	1620
514	A E S A L K T L Y T N K G T R I E E L A K Y L A V L D	540
1621	TTTGATTATGAAGTTGGATGTGGAGAATCTGTGCATCTACAATCAGGGAGCAGCACACAACCACAGTGGTGGATGCTGGC	1701
541	F D Y E V G C G E S V H L Q S G S S T Q P P V V D A G	567
1702	GTGGATACTGGCAAGGATGAGAAAGAGAGCAATAAAGGAAAAGGCTCTGAAAGCAGTGAAGGATCAGGCAACACTAGC	1782
568	V D T G K D E K E K S N K G K G S E S S E G S G N T S	594

1783	CGTGGAAACAGAGAATCAGTCAATGAGAGACAAGGATGTGAATGCTGGTTCAAGAGGAAAGGTTGTTCTCGGCTTCAGAAG	1863
595	R G T E N Q S M R D K D V N A G S R G K V V P R L Q K	621
1864	ATCACAAGAAATGAATTTGCCAATGGTGAAGGGAATGTGATCTTGAATTTGGACCATCTGTTAGATTACAAGCCAGAG	1944
622	I T K K M N L P N V K G N V I L M L D H L L D Y K P E	648
1945	CAAACTGATCTTTCAACACAAGAGCAACAAAGATGCAGTTTGAGATGTGGTACAATGCTGTGAAGGGCGAGTATGAGATA	2025
649	Q T D L F N T R A T K M Q F E M N Y N A V K G E Y E I	675
2026	AATGATGAACAGATGTCAATTGTGATGAATGGCTTTATGGTGTGGTGTATTGACAATGGCACTTCACCAGATGTGAATGGA	2106
676	N D E Q M S I V M N G F M V N C I D N G T S P D V N G	702
2107	ACATGGGTGATGATGGATGGAGATGAGCAAGTGAATATCCTCTCAAAACCAATGGTTGAGAATGCAAAACCAACTTCGG	2187
703	T W V M N D G D E Q V E Y P L K P M V E N A K P T L R	729
2188	CAAATCATGCACCATTTCTCAGATGCAGCTGAAGCATATATTGAGATGAGAAATTCGAACGACCGTACATGCCTAGGTAC	2268
730	Q I M N H F S D A A E A Y I E M R N S E R P Y M P R Y	756
2269	GGATTGCTTCGGAATTTGAGGGACAAAAATTTAGCTCGCTACGCTTTCGACTTCTATGAAGTAACCTCTAAGACATCAGAT	2349
757	G L L R N L R D K N L A R Y A F D F Y E V T S K T S D	783
2350	CGTGCAAGGGAAGCAGTAGCACAGATGAAGGCAGCAGCCCTCAGCAATGTTAACAGCAAGTTGTTGGACTTGATGGGAAT	2430
784	R A R E A V A Q N K A A A L S N V M S K L F G L D G N	810
2431	GTGGCAACAACCGAGAGTAATCTGAAAGGCACACTGCAAGGGACGTCAATCAGAACATGCATACCTTCTTGGCATGGGT	2511
811	V A T T S E N T E R N T A R D V M Q N M H T L L G M G	837
2512	TCTGCGCAGTAGAGATTGGGTCAACTGATCACAGTTAGAATCTCGCGTCGCTAAATAATTTCAATAGTAGTCTTTTATGT	2592
838	S A Q *	842
2593	TCTCTTAGTTTCAGTGTGGTTTTACCACCATTGTCTAACTATTGTGATAGTGTGGTTGGTCCACCAACATATTGTGAGTA	2673
842		842
2674	CTTTATGTTTATAAGTAAGCCGGAAGAACCATTGCAATGGTGAGGACGTGCAGAGTGATTCTATCACGTGTCATGGGGTAG	2754
842		842
2755	CTACGGCAATGCTTGTGTGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	2793
842		842

ภาพที่ 24 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA จากจีโนมด้าน 3'-terminal ของเชื้อ PSIV-SN และ ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์จาก ORF 1 แสดงไว้ใน บรรทัดล่างต่อจากลำดับนิวคลีโอไทด์

จัดเรียงตามคุณลักษณะที่จะเกิดขึ้นจากปลาย 5' ไปยังปลาย 3' ของจีโนม PSIV-SN ดังนี้ ยีน Nla บางส่วน (1-114), ยีน replicase (Nlb, 115 - 1662), ยีนโปรตีน ห่อหุ้ม (CP, 1663 - 2523) , 3' non-coding region (NCR, 2524 - 2776) และ poly A tail (2777 - 2793)

เครื่องหมาย ▲ แสดง putative cleavage sites ระหว่าง Nla/Nlb กับ Nlb /โปรตีนห่อหุ้ม ตามลำดับ

ขีดเส้นใต้ แสดง "GDD "motif ของยีน replicase และ "DAG" motif ในส่วนของยีน โปรตีนห่อหุ้ม ตามลำดับ

3. การวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนกับไวรัสชนิดอื่น ๆ

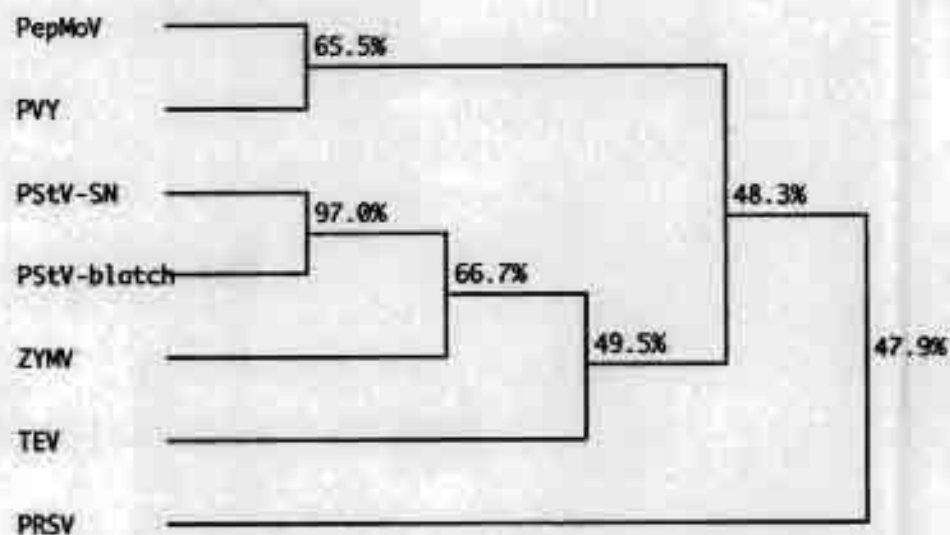
ก. ยีน replicase หรือ viral replicase หรือ RNA-dependent RNA polymerase

Nuclear inclusion protein b (Nib) เชื่อกันว่ามีบทบาทในการเป็นเอนไซม์ viral replicase หรือ RNA-dependent RNA polymerase ของไวรัสในกลุ่ม potyviruses โดยลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับไวรัสในกลุ่ม comoviruses และ picornaviruses (Domier *et al.*, 1987; Dougherty and Carrington, 1988; Lain *et al.*, 1989, Robaglia *et al.*, 1989) และมี GDD motif ที่เป็นส่วน conserved structure สำหรับ nucleotide binding ซึ่งพบในเอนไซม์ viral RNA-dependent RNA polymerase

ถึงแม้ว่าลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Nib ไม่ได้เป็นมีบทบาทสำหรับจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสในวงศ์ Potyviridae อย่างไรก็ตามในไวรัสชนิดเดียวกันจะมีความคล้ายคลึงกันมาก ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Nib ของเชื้อ PSTV-SN กับ PSTV-blotch พบว่ามีความเหมือนกัน 97.0 % homology และอยู่ในช่วง 42.3 - 63.3 % เมื่อเปรียบเทียบกับไวรัส species อื่น ๆ ที่อยู่ในวงศ์ Potyviridae เหมือนกัน ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 (ภาพที่ 25)

ตารางที่ 1. รายชื่อไวรัสและ accession number ที่นำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Nib (replicase) มาเปรียบเทียบกัน

ชื่อย่อ	ชื่อเต็ม	Accession number
PSTV-blotch	Peanut stripe <i>Potyvirus</i> -blotch strain	U05771
PSTV-SN	Peanut stripe <i>Potyvirus</i> -severe necrotic strain	AF200624
PepMoV	Pepper mottle <i>Potyvirus</i>	M96425
PVY	Potato virus Y <i>Potyvirus</i>	X12456
PRSV	Papaya ring spot <i>Potyvirus</i>	S46722
TEV	Tobacco etch <i>Potyvirus</i>	M11458
ZYMV	Zucchini yellow mosaic <i>Potyvirus</i>	L31350



ภาพที่ 25 Phylogenetic tree ของลำดับการถอดมิโน Nib protein (replicase) ระหว่างเชื้อ PStV-SN กับ PStV-blotch และ potyviruses ชนิดอื่นๆวิเคราะห์โดยวิธี UPMGA โปรแกรม DNASIS (version3.7)

ข. ยีนโปรตีนห่อหุ้ม (coat protein gene)

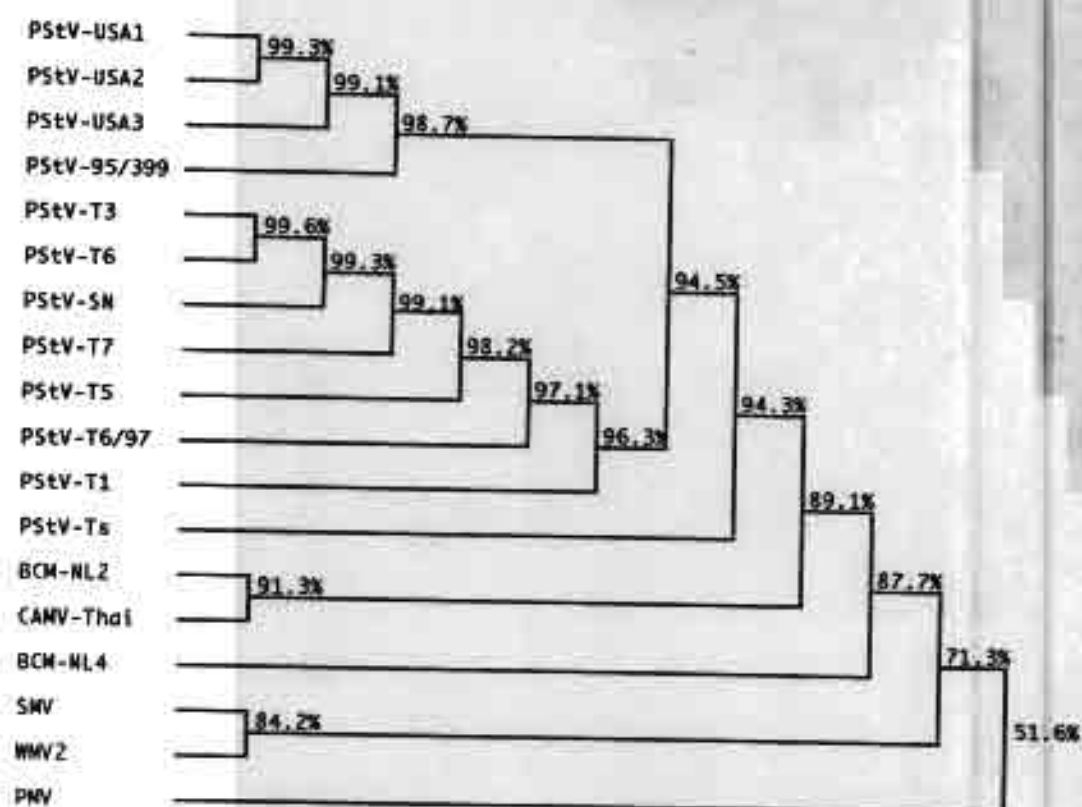
หน้าที่ของโปรตีนห่อหุ้มที่ทราบแล้วในขณะนี้ คือ การห่อหุ้มอยู่รอบจีโนม (viral RNA) และเกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดไวรัสโดยพาหะ (Atreya *et al.*, 1990) ตลอดจนการเคลื่อนย้ายของไวรัสในระหว่างเซลล์ (cell-to-cell movement) (Shukla *et al.*, 1994) ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนห่อหุ้ม เป็นดัชนีสำคัญในการจัดจำแนกไวรัสในวงศ์ *Potyviridae* โดยไวรัสต่างชนิดกันมีความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนของยีนโปรตีนห่อหุ้มในช่วง 37-71 % homology ในขณะที่ไวรัสชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ จะมีความคล้ายคลึงกันมากโดยอยู่ในช่วง 90-99 % homology (Shukla, 1988, Rybicki and Shukla, 1992)

ผลการเปรียบเทียบลำดับและกรดอะมิโนในส่วนโปรตีนห่อหุ้มของ PSIV-SN กับ PSIV สายพันธุ์ต่าง ๆ และไวรัสชนิดอื่น ๆ (ตารางที่ 2) และวิเคราะห์แบบ UPMAG โดยโปรแกรม DNASIS สามารถจัดจำแนกให้ PSIV-SN เป็นสายพันธุ์ใหม่ของเชื้อ PSIV โดยมีความคล้ายคลึงกับ PSIV-T3 (อาการต่างจำ และทำให้เกิดเนื้อเยื่อตายในถั่วพุ่ม) และ PSIV-T6 (อาการเนื้อเยื่อตาย) มากที่สุดคือ 99.6 % รองลงมาคือ PSIV-T7 (อาการต่างจำ) (99.1%) , PSIV-T5 (อาการต่างวงแหวน) (98.2%) , PSIV-T6/97 (อาการต่างขีด เนื้อเยื่อตาย) (97.1%), และ PSIV-T1 (อาการต่างไม่ชัดเจน) (96.3%) ตามลำดับ และพบความแตกต่างมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ PSIV-USA strains (อาการต่างจำ) (94.5%) และ PSIV-Ts (อาการเนื้อเยื่อตาย) จากไต้หวัน (94.3 %) แสดงในภาพที่ 26

เมื่อพิจารณาจากลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนห่อหุ้มของ PSIV-T6/97 และ PSIV-SN ซึ่งต่างก็ทำให้เกิดอาการเนื้อเยื่อตายบนถั่วลิสงไทนาน 9 แต่อาการจาก PSIV-SN รุนแรงกว่า เก็บรักษาเชื้อไว้ในสภาพเหมือนกัน และโคลนยีนในเวลาใกล้เคียงกันและด้วยเทคนิคเดียวกัน พบว่า มีความแตกต่างกันอยู่ 4 จุด (ภาพที่ 27) คือ (1) กรดอะมิโนที่ 153 ของ PSIV-T6/97 เป็น A ส่วนใน PSIV-SN เป็น T; (2) กรดอะมิโนที่ 218 และ 219 ของ PSIV-T6/97 เป็น SC ส่วนใน PSIV-SN เป็น AR; (3) กรดอะมิโนที่ 233 ของ PSIV-T6/97 เป็น G ส่วนใน PSIV-SN เป็น D; และ (4) กรดอะมิโนที่ 242 ของ PSIV-T6/97 เป็น L ส่วนใน PSIV-SN เป็น M ซึ่งความแตกต่างบนส่วนจีโนมเหล่านี้จะมีผลกระทบต่อระดับความรุนแรงของอาการโรคบนถั่วลิสงหรือไม่นั้น จำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไป แต่จากรายงานของ Higgins *et al.* (1998) สรุปไว้ว่าส่วนของโปรตีนห่อหุ้มไม่น่าเกี่ยวข้องกับการกำหนดลักษณะอาการของโรค เนื่องจากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ PSIV-T3 (ต่างจำในถั่วลิสง และเนื้อเยื่อตายในถั่วพุ่ม) และ PSIV-T6 (เนื้อเยื่อตายในถั่วลิสง) พบว่ามีความเหมือนกัน 100 %

ตารางที่ 2 ชนิดของไวรัสที่นำมาเปรียบเทียบกับเชื้อ PSIV-SN ในด้านความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนห่อหุ้ม

ชนิดไวรัส	Accession number
Bean common mosaic virus NL-2 (BCMV-NL-2)	L19473
Bean common mosaic virus-NL4 (BCMV-NL4)	L21766
Cowpea aphid-borne mosaic virus (CAMV)	U72204
Peanut stripe virus-T1	Y11776
Peanut stripe virus-T3	Y11771
Peanut stripe virus-T5	Y11772
Peanut stripe virus-T6	Y11773
Peanut stripe virus-T6/97 (PSIV-T6/97)	AF073380
Peanut stripe virus-T7 (PSIV-T7)	Y11774
Peanut stripe virus-severe necrotic (PSIV-SN)	AF200623, AF200624, AF191748
Peanut stripe virus-Ts (PSIV-Ts)	AF063222
Peanut stripe virus-blotch USA1	U34972
Peanut stripe virus-blotch USA2	U05771
Peanut stripe virus-blotch USA3	X63559
Peanut stripe virus- 95/399	Y11775
Pepper mottle virus (PMV)	M96425
Soybean mosaic virus (SMV)	S42280
Watermelon mosaic virus-2	L22907



ภาพที่ 26 Phylogenetic tree ของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนห่อหุ้มจากเชื้อ PStV-SN เปรียบเทียบกับ PStV สายพันธุ์อื่นๆ และ potyviruses ชนิดอื่นๆ (ตารางที่ 2)

DNASIS

Maximum Matching [PStV-SN VS PStV-T6/97]

File1: PStV-SN

1 - 287

File2: PStV-T6/97

1 - 287

Matching Percentage (Total Window: 97%, Alignment Window: 97%)

1	SGSSTQPPVVDAGVDTGKDEKEKSNKGKGSSESSESGNTSRGTENQSMRD	50
1	SGSSTQPPVVDAGVDTGKDEKEKSNKGKGSSESSESGNTSRGTENQSMRD	50
51	KDVNAGSRGKVVPRQLQITKKMNLPMVKGNVILNLDHLLDYKPEQTDLFN	100
51	KDVNAGSRGKVVPRQLQITKKMNLPMVKGNVILNLDHLLDYKPEQTDLFN	100
101	TRATKMQFEMWYNAVKGEYEINDEQMSIVMNGFMVWCIDNGTSPDVNGTW	150
101	TRATKMQFEMWYNAVKGEYEIDDEQMSIVMNGFMVWCIDNGTSPDVNGAW	150
151	VMDGDEQVEYPLKPMVENAKPTLRQIMHHFSDAAEAYIEMRNSERPYP	200
151	VMDGDEQVEYPLKPMVENAKPTLRQIMHHFSDAAEAYIEMRNSEQPYMP	200
201	RYGLLRNLRDKNLARYAFDFYEVTSKTSDRAREAVAQMKAAALSNVNSKL	250
201	RYGLLRNLRDKNLSCYAFDFYEVTSKTSGRAREAVAQLKAAALSNVNSKL	250
251	FGLDGNVATTSETERHTARDVNQNMHTLLGMGSAQ*.....	300
251	FGLDGNVATTSETERHTARDVNQNMHTLLGMGSAQ*.....	300

ภาพที่ 27 Maximum matching ของลำดับกรดอะมิโนจากโปรตีนห่อหุ้มของเชื้อ PStV-SN เปรียบเทียบกับ PStV-T6/97 โดยโปรแกรม DNASIS(version 3.7)

ด. 3' non-coding region

ส่วน 3' non-coding region ของ potyviruses เป็นส่วนที่มีความผันแปรกันอย่างมากทั้งในด้านความยาวและลำดับนิวคลีโอไทด์ (Lain et al., 1988; Frenkel et al., 1989; Turpen, 1989) ส่วนใหญ่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น AU-rich sequences ส่วนนี้ต่อท้ายด้วย poly A-tail ซึ่งกำหนดมาโดยจีโนมไวรัส หน้าที่ที่สำคัญที่สุดของส่วน 3' non-coding region คือเป็นบริเวณที่เกิดปฏิกิริยากับ viral replicase ในระหว่างการสังเคราะห์ minus-strand RNA และป้องกันการเกิด exonucleolytic degradation ของจีโนมไวรัส (Bryan et al., 1992; Dolja and Carrington, 1992)

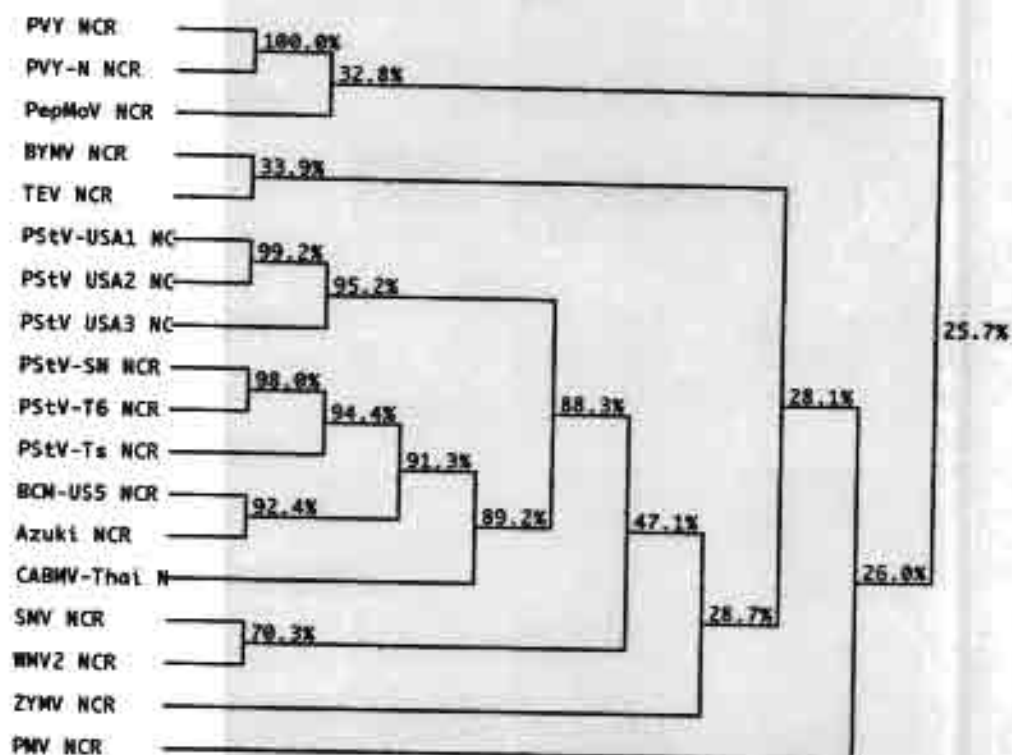
ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน 3' non-coding region สามารถนำมาใช้ในการจัดไวรัสในระดับสายพันธุ์ของไวรัสชนิดใดชนิดหนึ่งในวงศ์ Potyviridae ได้ โดยไวรัสที่เป็นชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์กันจะมีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนดังกล่าวนี้ แต่ในไวรัสที่ต่างชนิดกันจะไม่พบความสัมพันธ์ที่เหมือนกันอย่างมีนัยสำคัญ (Frenkel et al., 1989; Frenkel et al., 1991)

เมื่อเปรียบเทียบส่วน 3' NCR ของ PSIV-SN กับ PSIV สายพันธุ์ต่างๆ ที่มีรายงาน พบว่าเชื้อ PSIV-SN มีความแตกต่างจาก PSIV-strains โดยมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสายพันธุ์ PSIV-T6 มากที่สุด (98.0% homology) รองลงมาคือ PSIV-Ts (94.4%) และมี % homology กับส่วน 3' NCR ของไวรัสชนิดอื่นๆ คือ bean common mosaic-US5, Azuki mosaic virus (91.3%) และ cowpea aphid borne mosaic virus-Thailand strain (98.2%) มากกว่าลำดับของส่วน 3' NCR จาก PSIV-USA strains (88.3% homology) (ภาพที่ 28) เช่นเดียวกับที่มีรายงานโดย Higgins et al. (1998) ซึ่งพิจารณาว่า PSIV-strains ที่พบในประเทศไทย เป็นสายพันธุ์ของ bean common mosaic virus แตกต่างจากกลุ่ม PSIV-strains จากสหรัฐอเมริกา และ อินโดนีเซีย

ตารางที่ 3 ชนิดไวรัสและ accession number ที่นำมาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน 3' non-coding region

ชนิดไวรัส	ชื่อย่อ	Accession number
Potato virus Y	Potato virus Y	D000441
Potato virus Y- N	Potato virus Y-N	X12456
Pepper mottle virus	PepMoV	M96425
Barley yellow mosaic virus	ByMV	X63358, S38044
Tobacco etch virus	TEV	M00458
Peanut stripe virus- blotch USA1	PSIV-USA1	U34972
Peanut stripe virus- blotch USA2	PSIV-USA2	U05771
Peanut stripe virus - blotch USA3	PSIV-USA3	X63559
Peanut stripe virus-severe necrotic	PSIV-SN	AF200623, AF200624, AF191748
Peanut stripe virus- T6	PSIV-T6	Y11773
Peanut stripe virus-Ts	PSIV-Ts	AF063222
Bean common mosaic virus- US5	BCM-US5	L21766
Azuki mosaic virus	Azuki	U60100
Cowpea aphid-borne mosaic virus- Thailand	CABMV-Thai	U72204
Watermelon mosaic virus-2	WMV-2	L22907
Soybean mosaic virus	SMV	S42280
Zucchini yellow mosaic virus	ZYMV	L31350
Peanut mottle virus	PMV	X73422

DNASIS Phylogenetic Tree [18 Sequences]



ภาพที่ 28 Phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 3' non-coding region ของเชื้อ PSIV-SN กับ PSIV-strains และ potyviruses อื่นๆ (ตารางที่ 3) เมื่อวิเคราะห์โดยโปรแกรม DNASIS version 3.7

สรุปผลการทดลองตลอดโครงการวิจัย

เชื้อไวรัส peanut stripe virus-severe necrotic strain (PSIV-SN) ทำให้เกิดอาการเนื่อเยื่อตายแบบรุนแรงในถั่วลิสง ใบด่างไม่ชัดเจน และบิดเบี้ยว ต้นแคระแกร็น หรือทำให้เหี่ยวตายได้ถ้าหากพืชได้รับเชื้อในขณะที่ยังเป็นต้นเล็ก สามารถแยกสกัดไวรัสบริสุทธิ์ได้ 5-8 ม.ก.จากใบถั่วลิสงเป็นโรค 100 กรัม อนุภาคไวรัสประกอบด้วยจีโนมที่เป็นโมเลกุล single stranded RNA และโปรตีนห่อหุ้มที่ประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อยเพียงชนิดเดียว น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 32 กิโลดาลตัน

จากการโคลนยีนทางด้านปลาย 3' ของจีโนมไวรัส โดยเทคนิค RT-PCR และ cDNA cloning แบบมาตรฐาน ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากโคลนที่คัดเลือกไว้ และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS version 3.7 ทำให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวน 2,793 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วยส่วนต่างๆ เรียงตามลำดับ คือ

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

ผลการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนห่อหุ้มและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 3' non coding region จำแนกได้ว่า PSIV-SN เป็นสายพันธุ์ใหม่ของ PSIV ที่ยังไม่มีการรายงานมาก่อน โดยมีความใกล้ชิดกับสายพันธุ์ PSIV-T6 มากที่สุด

เทคนิคต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง และข้อควรระมัดระวังในการทดลองที่ได้รับจากโครงการวิจัยนี้ แสดงไว้ในตาราง ที่ 4

หัวข้อ	เทคนิค / วิธีการ
1. การแยกอนุภาค PSIV-SN บริสุทธิ์	- ใช้ใบแก้วลิสงเป็นโรคซึ่งแช่แข็งไว้ที่ -80°C. 100 กรัม / ครั้ง - บัฟเฟอร์สกัด คือ 0.5 M potassium phosphate, pH 7.7 ที่เติม 0.02 M sodium sulfite และ 1% 2-mercaptoethanol (v/v) - clarification น้ำคั้นพืชโดย chloroform อัตรา 10 % (v/v) กวนตลอดเวลานาน 30 นาที - ตกตะกอนไวรัสจากส่วนน้ำใสด้วย 0.1 M NaCl และ 8% PEG (6000) นาน 2 ชั่วโมง - เก็บตะกอนไวรัสโดยการปั่นเหวี่ยงที่ $10,000 \times g$ นาน 30 นาที - ละลายตะกอนใน 0.5 M potassium phosphate buffer, pH 7.7 + 1 mM EDTA - แยกส่วนประกอบของเซลล์พืชออกโดย 40% sucrose cushion centrifugation - ตกตะกอนไวรัสออกจากชั้นของบัฟเฟอร์เหนือชั้นของ sucrose cushion - ละลายตะกอนไวรัสด้วย 1 -1.5 มล. ของ 0.05 M KPB, pH 7.7 - ทำให้ไวรัสบริสุทธิ์ มากยิ่งขึ้นโดยใช้ sucrose density gradient centrifugation - คัดเฉพาะแถบของไวรัสมาเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ 0.05 M KPB, pH 7.7 ที่เติม 1 mM EDTA อย่างน้อย 2.5 เท่าของปริมาตรบัฟเฟอร์ที่มีไวรัส - ปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนไวรัสที่ความเร็ว 35,000 รอบ/นาที (Beckman, 70 Ti Rotor) นาน 1.5 ชั่วโมง - ละลายตะกอนอนุภาคด้วยบัฟเฟอร์ 0.01 M KPB, pH 7.0 ในอัตรา 0.5 -1 มล. - เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80°C
2. การสกัด total RNAs จากใบพืชเป็นโรค เพื่อเป็น template ในการสังเคราะห์ cDNA ด้วยเทคนิค RT-PCR	วิธีการของ Hammond and Lawson (1988) - บดใบแก้วลิสงเป็นโรค 1 ใบย่อย ใน buffer A (0.5 M potassium phosphate, pH 8.3 , 0.5% (W / V) sodium sulfite) ปริมาตร 500 μl - แยกเก็บส่วนน้ำใสโดยปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ/นาที ที่ 4°C นาน 10 นาที โสกลงในหลอดใหม่และปรับปริมาตรเป็น 500 μl ด้วย buffer A

3. การสกัด RNA จาก อนุภาคไวรัสบริสุทธิ์

- เติมน้ำละลาย buffer B (5% Triton X-100, 4% PEG (6000), 0.1 M NaCl) ปริมาตร 500 μ l บ่มบนน้ำแข็ง นาน 1 ชั่วโมง
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที ที่ 4°C. นาน 10 นาที
- ละลายตะกอนด้วย TE buffer, pH 8.0 ปริมาตร 10 μ l
- เก็บรักษาไว้ที่ -80°C จนกว่าจะนำมาสังเคราะห์ cDNA

phenol / chloroform extraction ของ Siri Wong (1995)

- เติม extraction buffer (0.05 M Tris-HCl, pH 8.5-9.0, 2% SDS, 1 mg/ml proteinase K) ในอัตราสารแขวนลอยไวรัสบริสุทธิ์ต่อ extraction buffer เท่ากับ 1: 3 (v/v)
- บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง
- เติม TE-saturated phenol : chloroform (1:1, v/v) ในอัตรา 1:1 พลิกหลอดที่บรรจุไปมาประมาณ 5 นาที
- ปั่นเหวี่ยงในเครื่อง microcentrifuge นาน 5 นาที
- ดูดส่วน aqueous phase ใส่ลงในหลอดใหม่
- phenol / chloroform extraction ซ้ำอีกจนไม่พบชั้นของโปรตีนระหว่าง aqueous phase และ phenol phase
- ตกตะกอนกรดนิวคลีอิกจาก aqueous phase โดยเติม 0.1 ปริมาตรของ 3 M sodium acetate, pH 5.4 และ 2.5 ปริมาตรของ ethanol บ่มที่ -80°C นาน 1 ชั่วโมง
- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 25 นาที
- ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ทำให้ตะกอนแห้ง
- ละลายใน TE buffer, pH 8.0 วัดความเข้มข้นของกรดนิวคลีอิกด้วยเครื่อง spectrophotometer

3. การโคลนนิ่งโดยวิธี มาตรฐาน (ใช้ oligo dT primer)

- สกัด RNA จากอนุภาคไวรัส
- สังเคราะห์ cDNA โดยใช้ cDNA synthesis kit (Pharmacia)
- เตรียม pUC118 / EcoRI overhang vector
- เชื่อมต่อ cDNA เข้ากับ pUC118/ EcoRI overhang vector
- ส่งถ่ายดีเอ็นเอสายผสมเข้าไปในเซลล์ *E. coli* JM109 โดยวิธี heat

shock หรือ gene pulser

- คัดเลือกโคลนที่มี cDNA โดยการวิเคราะห์ขนาดพลาสมิด
- วิเคราะห์ขนาดพลาสมิดหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* แล้วแยกขนาดโดย gel electrophoresis
- คัดเลือกโคลนที่มีส่วนยีนโปรตีนห่อหุ้มโดยใช้ cDNA probe ที่จำเพาะกับยีนโปรตีนห่อหุ้มตามวิธี southern blot hybridization เพื่อเป็นตัวแทนสำหรับตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ข้อดี : (1) เหมาะสมสำหรับการโคลนยีนไวรัสที่มีจีโนมเป็น ssRNA และมี poly A ในบริเวณปลาย 3' ของจีโนม (2) ไม่จำเป็นต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมไวรัสเป้าหมายมาก่อน

ข้อเสีย : (1) ต้องใช้ genomic RNA ที่สกัดได้จากอนุภาคไวรัสบริสุทธิ์ จึงต้องใช้อนุภาคไวรัสจำนวนมาก และในขั้นตอนการสกัด RNA ต้องกระทำอย่างระมัดระวังเพื่อไม่ให้เกิดการขาดของโมเลกุล RNA นอกเหนือไปจากการระมัดระวังการปนเปื้อนของ RNase ในปฏิกิริยา
(2) เพิ่มขั้นตอนการเตรียมเวกเตอร์ให้เหมาะสมกับปลายของโมเลกุล cDNA ที่สร้างขึ้น
(3) ประสิทธิภาพการโคลนยีนต่ำลงได้ถ้าหากการเตรียมเวกเตอร์ไม่สมบูรณ์เพียงพอ หรือเตรียม competent cells ไม่ดี

5. การโคลนยีนโดยเทคนิค RT-PCR

- สกัด RNA จากอนุภาคไวรัส หรือ total RNAs จากใบพืชเป็นโรค
- สังเคราะห์ first strand cDNA ที่อุณหภูมิ 42 C นาน 60-90 นาที โดยใช้ reverse primer ก่อน
- สังเคราะห์ second strand cDNA และเพิ่มปริมาณ ds cDNA ด้วย PCR ในหลอดปฏิกิริยาที่มีทั้ง forward และ reverse primers ร่วมกับ first strand cDNA ที่สร้างขึ้นมา โดยมีโปรแกรมการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่ คือ step 1 : 94 ซ นาน 5 นาที, 1 รอบ
- ตรวจสอบ PCR product ด้วย gel electrophoresis
- แยก PCR product ที่ต้องการออกจากเจล
- โคลน PCR product ใน pGEM-T หรือ pGEM-T easy vector
- คัดเลือกโคลนบนอาหารคัดเลือกที่มี 100 มก./ลิตร ampicillin

- วิเคราะห์ขนาดของพลาสมิดสายผสม(recombinant plasmid)
- คัดเลือกโคลนตัวแทนสำหรับตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ข้อดี : (1) ใช้ปริมาณ genomic RNA จากอนุภาคไวรัสในปริมาณน้อยมาก ไม่จำเป็นต้องแยกสกัดอนุภาคไวรัสออกมาเป็นจำนวนมาก
 (2) สามารถใช้ total RNAs ที่สกัดได้จากใบพืชเป็นโรคมารับเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณ cDNA ได้ โดยไม่ต้องแยกไวรัสบริสุทธิ์
 (3) เวกเตอร์ pGEM-T หรือ pGEM-T easy มีขายทั่วไป ไม่จำเป็นต้องมาจัดเตรียม vector
 (3) ลดขั้นตอนต่างๆ ทำให้ใช้เวลาในการโคลนยีนสั้นลง

ข้อเสีย: (1) ต้องมี primers ที่เหมาะสม นั่นคือ จำเป็นต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสเป้าหมายแล้วบางส่วน หรือ จำเป็นต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสที่เกี่ยวข้องกับไวรัสเป้าหมายอย่างใกล้ชิด ก่อน เพื่อประกอบการออกแบบ degenerate primers ที่เหมาะสม
 (2) จำเป็นต้องมีเครื่องมือ Thermal cycler

6. การคัดเลือกโคลน

- เมื่อใช้เวกเตอร์ pUC118 พบปัญหาคือ โคโลนีสีขาวที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่มี insert cDNA ขนาดเล็ก การคัดเลือกโคลนที่ต้องการจึงจำเป็นต้องเลือกจากโคโลนีจำนวนมาก
- เมื่อใช้เวกเตอร์ pGEM-T/ pGEM-T easy ไม่จำเป็นต้องเติม IPTG/X-gal ลงไปในอาหารสำหรับคัดเลือก recombinant clones ใช้เฉพาะ ampicillin ก็เพียงพอ เนื่องจากบางโคลนที่ให้โคโลนีสีฟ้า พบว่ามีส่วนของ insert cDNA อยู่ด้วย
- การวิเคราะห์ขนาดของ insert DNA อาจมีปัญหาในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่แนะนำตาม map ของเวกเตอร์ ซึ่งอาจเกิดจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณส่วนปลายของโมเลกุล insert cDNA มีการเปลี่ยนแปลงไปหลังจากขั้นตอน ligation กับเวกเตอร์ การคัดเลือกโคลนที่แท้จริงออกมาอาจจำเป็นต้องใช้เทคนิคอื่นๆ มาประกอบ

7. DNA sequencing

ปัจจัยที่ควรต้องคำนึงถึง ได้แก่

- จำนวนโคลนที่ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ควรมีหลายโคลน และมีขนาดของ insert cDNA ที่เหมือนกัน
- ความสะอาดของ DNA template สำหรับปฏิกิริยา DNA sequencing การทำความสะอาดด้วยวิธี phenol-chloroform extraction บางครั้งอาจไม่ประสบผลสำเร็จในนำไปเป็น template สำหรับปฏิกิริยา DNA sequencing ไม่สามารถอ่านข้อมูลได้ หรืออ่านได้สั้นมาก การใช้ DNA purification kit ต่างๆ ช่วยอำนวยความสะดวกในขั้นตอนนี้ได้
- การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ insert cDNA ที่มีความยาวมากกว่า 800 bp กระทำได้โดยหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากปลายหัว (5') - ท้าย (3') เข้าไปก่อน แล้วออกแบบ sequencing primers ใหม่ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบแล้วทั้งสองข้างของ insert cDNA ทำให้สะดวกและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดได้รวดเร็วกว่าวิธี sub cloning หรือ deletion cloning

8. การวิเคราะห์ลำดับ
นิวคลีโอไทด์ ของไวรัสเป้า
หมาย ด้วยโปรแกรม
DNASIS

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม DNASIS ไม่แตกต่างกับการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมผ่านทาง internet เช่น Blast version 2.0

บทวิจารณ์

เชื้อ PSIV-SN เป็นไวรัสรูปร่างเป็นท่อนยาวคด พบเป็นจำนวนมากในใบพืชเป็นโรคเมื่อตรวจนำคั้นพืชนั้นด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ในการวิจัยครั้งนี้ประสบผลสำเร็จในการแยกอนุภาค PSIV-SN ออกจากใบถั่วลิสงที่เป็นโรค โดยได้ปริมาณอนุภาคไวรัส 5-8 มก.ไวรัส/100 กรัมใบพืชสด อย่างไรก็ตาม ปริมาณอนุภาคไวรัสที่ได้รับอาจทำให้เพิ่มมากขึ้นได้โดยการระมัดระวังในขั้นตอนของการละลายตะกอนที่มีอนุภาคไวรัสเป็นองค์ประกอบหลักให้มีการละลายเป็นอย่างดีไม่มีส่วนก่อนตะกอนอยู่ ก่อนนำไปแยกส่วนโดยการปั่นเหวี่ยงเหนือชั้นน้ำตาล (sucrose cushion) หรือในชั้นน้ำตาลต่างระดับ (sucrose gradients)

คุณสมบัติกรดนิวคลีอิกและโปรตีนห่อหุ้มของ PSIV-SN ที่ได้รับจากการศึกษาครั้งนี้ สอดคล้องกับคุณสมบัติของไวรัสในวงศ์ Potyviridae (Shukla *et al.*, 1994) คือ มีจีโนมเป็น single-stranded RNA และโปรตีนห่อหุ้มมีโปรตีนหน่วยย่อยเพียงหนึ่งชนิด ขนาดประมาณ 32 kDa

การโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้ม ของ PSIV-SN สามารถประสบผลสำเร็จได้ทั้งโดยเทคนิค RT-PCR ด้วย specific หรือ degenerate primers และ cDNA cloning โดยใช้ oligo (dT) primer อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าการโคลนยีนด้วยเทคนิค RT-PCR ประสบผลสำเร็จได้โดยง่าย และรวดเร็วกว่าการโคลนยีนแบบมาตรฐาน และไม่จำเป็นต้องใช้อ่อนภาคไวรัสบริสุทธิ์มาก แต่จำเป็นต้องมี primers ที่เหมาะสม จึงจะเริ่มได้ จากการวิจัยครั้งนี้เมื่อใช้ specific primers ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มจากเชื้อ CAMV ในบริเวณที่ค่อนข้างคงที่ (conserved sequence) กับไวรัสในจีนัส *Potyvirus* และ primers ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PSIV-blotch สามารถโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มของ PSIV-SN ได้เพียงบางส่วนเท่านั้น

การใช้ข้อมูลข่าวสารที่ทันสมัยสามารถช่วยให้งานประสบผลสำเร็จได้รวดเร็วขึ้น จะเห็นได้ชัดจากการใช้ degenerate primers ที่ออกแบบมาสำหรับโคลนยีนปลาย 3' ของจีโนมในจีนัส *Potyvirus* เมื่อนำมาประยุกต์ใช้สำหรับโคลนยีนของเชื้อ PSIV-SN ก็ประสบผลสำเร็จได้ เช่นเดียวกับที่มีรายงานในการโคลนยีน potyviruses หลายๆ ชนิด เช่น zucchini yellow mosaic virus, sugarcane mosaic virus, turnip mosaic virus เป็นต้น (Gibbs and Mackenzie, 1997; Thomson *et al.*, 1995) นอกจากนี้ยังสามารถใช้ระบบ RT-PCR cloning ร่วมกับการออกแบบ specific primer สำหรับโคลนยีนเป้าหมายบางอย่างจากเชื้อไวรัสของ unknow isolate(strain) ได้รวดเร็วมากขึ้น เช่นกรณีที่ได้โคลนยีน replicase ของเชื้อ PSIV-SN โดยการใช้ข้อมูลในบริเวณที่เป็นส่วนที่คงที่มาก (conserved sequence) ที่อยู่ด้าน upstream ของยีนเป้าหมายจากไวรัสที่คาดว่าเป็นชนิดเดียวกันมาเป็น forward primer (ในที่นี้คือ เชื้อ PSIV-blotch) และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบแล้วทางด้านส่วนปลาย 5' ของ unknown isolate (strain) (ในที่นี้คือ PSIV-SN) มาออกแบบเป็น reverse primer เพื่อโคลนดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างกลางของส่วน

primer ทั้งสอง (ส่วนของยีน replicase ที่ยังไม่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์) ตามขั้นตอนของ RT-PCR cloning

การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ดีเอ็นเอ เช่น DNASIS หรือการวิเคราะห์โดยทาง internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) โดยโปรแกรม Blast version 2.0 พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้น จากพื้นฐานการจัดแบ่งไวรัสในวงศ์ Potyviridae ที่อาศัยลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนห่อหุ้ม และลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน 3' non-coding region เป็นเครื่องหมาย สามารถจัดจำแนกเชื้อ PSIV-SN เป็นสายพันธุ์ใหม่ของ PSIV ที่พบในประเทศไทยที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน การจัดแบ่งตามวิธีทางนี้ให้ผลสอดคล้องกับการจัดจำแนกแบบดั้งเดิมซึ่งใช้การพิจารณาจากคุณสมบัติทางชีววิทยาของเชื้อ (เช่น การสร้าง inclusion bodies, อาการโรคบนพืชอาศัยชนิดต่างๆ, ความรุนแรงของโรค เป็นต้น) และคุณสมบัติทางชีววิทยา (ยวดี, 2534; อภิเดช, 2542)

PSIV-SN ทำให้เกิดอาการของโรครุนแรงที่สุดในกลุ่มของ PSIV สายพันธุ์ต่างๆ ที่พบในประเทศไทย เมื่อเปรียบเทียบกับ PSIV สายพันธุ์ที่มีรายงานในสหรัฐอเมริกา อินโดนีเซียและไต้หวัน แล้วพบมีความแตกต่างกันทั้งในระดับชีวโมเลกุลและชีววิทยาของเชื้อ (Chang *et al.*, 1990, Demski *et al.*, 1993, Teycheney and Dietzgen, 1994, Gunasinghe *et al.*, 1994, Pappu *et al.*, 1998 Higgins *et al.*, 1998)

แนวทางต่อไปของการใช้ประโยชน์จากการวิจัยครั้งนี้ คือ การแนะนำเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่างเนื้อเยื่อตายแบบรุนแรงของถั่วลิสงให้กับนักวิชาการผู้ผลิตถั่วลิสงเพื่อบริโภคหรือเมล็ดพันธุ์ และผู้สนใจทั่วไป การปรับปรุงพันธุ์ถั่วลิสงที่มีคุณสมบัติทางเขตรกรรมที่ดีให้มีความต้านทานต่อโรคใบด่างขีดหรือใบด่างเนื้อเยื่อตายที่เกิดจากเชื้อ PSIV สายพันธุ์ต่างๆ เพิ่มขึ้นมาอีกลักษณะหนึ่ง โดยการส่งถ่ายส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้ม หรือ antisense ของยีน replicase หรือ combination ของทั้งสองยีนจากเชื้อ PSIV-SN ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่รุนแรงที่สุดนี้ ให้เข้าไปสอดแทรกอยู่ในจีโนมของถั่วลิสงพันธุ์ดังกล่าวตามหลักการของ pathogen derived resistance ซึ่งระบบการถ่ายยีนอาจจะทำได้โดยอาศัย *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะ หรือ วิธีการถ่ายยีนโดยตรง (direct gene transfer) โดยใช้ particle bombardment

เอกสารอ้างอิง

- โสภณ วงศ์แก้ว และสุมิตรา กันตรง. 2532. ผลกระทบของโรคใบด่างขีดต่อผลผลิตของถั่วลิสง. ใน รายงานการสัมมนาถั่วลิสง ครั้งที่ 8, หน้า 180-182. อารันต์ พัฒโนทัย, บรรณาธิการ. ขอนแก่น : คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ยุวดี ชูประภาวรรณ. 2536. โรคใบด่างกระของถั่วลิสงที่เกิดจากเชื้อ Peanut mottle virus ในประเทศไทย : ทบทวนการศึกษาใหม่. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาโรคพืชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- อภิเดช แสงดี. 2542. การเปรียบเทียบเชื้อ peanut stripe Potyvirus สองไอโซเลตที่ทำให้เกิดอาการ เนื้อเยื่อตายบนถั่วลิสง และพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อโดยเทคนิคกรดนิวคลีอิกไฮบริดเชน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาโรคพืชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- Atreya, C.D. 1992. Application of genome sequence information in potyvirus taxonomy: an overview. Archives of Virology [Supplement] 5 : 17-23.
- Bryan, G.T., Gardner, R.C. and Foster, R.L.S. 1992. Nucleotide sequence of the coat protein gene of a strain of clover yellow vein virus from New Zealand: Conservation of a stem-loop structure in the 3' region of potyviruses. Archives of Virology 124 : 133-146.
- Carr, J.P. and Zaitlin, M. 1993. Replicase-mediated resistance. Seminar in Virology 4: 339-347.
- Chang, C.A., Purcifull, D.E. and Zettler, F.W. 1990. Comparison of two strains of peanut stripe virus in Taiwan. Plant Disease 74 : 593-596.
- Damski, J.W., Reddy, D.V.R., Wongkaew, S., Xu, Z.Y., Kuhn, C.W., Cassidy, B.G., Shukla, D.D., Saleh, N., Middleton, K.J., Sreenivasulu, P., Prasada Rao, R.D.V.J., Senboku, T., Dollet, M. and McDonald, D. 1993. Peanut Stripe Virus. Information Bulletin no. 38. (in En. Summaries in En, Fr, Es.) Patancheru, A.P. 502 324, India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, and Griffin, GA 30223, USA: Peanut Collaborative Research Support Program. 20 pp. ISBN 92-9066-262-X. Order Code: IBE 038.
- Dolja, V.V. and Carrington, J.C. 1992. Evaluation of positive-strand RNA viruses. Seminar in Virology 3: 315-326.
- Domier, L.L., Shaw, J.G. and Rhoades, E. 1987. Potyviral proteins share amino acid sequence homology with picorna-, como-, and caulimo viral proteins. Virology 158: 20-27.

- Dougherty, W.G. and Carrington, J.C. 1988. Expression and function of potyviral gene products. *Annual Reviews of Phytopathology* 26: 123-143.
- Frenkel, M.J., Ward, C.W. and Shukla, D.D. 1989. The use of 3' non-coding nucleotide sequences in the taxonomy of potyviruses: application to watermelon mosaic virus2 and soybean mosaic virus-N. *Journal General Virology* 70: 2775-2783.
- Frenkel, M.J., Jilka, J.M., Shukla, D.D. and Ward, C.W. 1991. Differentiation of potyviruses and their strains by hybridization with the 3' non coding region of the viral genome. *Journal Virological Methods* 36: 51-62.
- Gibbs, A. and Mackenzie, A. 1996. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 63: 9-16.
- Gubler, U. and Hoffman, B.J. 1983. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25 : 263.
- Gunasinghe, U.B., Flasiński, S., Nelson, R.S. and Cassidy, B.G. 1994. Nucleotide sequence and genome organization of peanut stripe potyvirus. *Journal of General Virology* 75:2519-2536.
- Hammond, J. and Lawson, R.H. 1988. An improved purification procedure for preparing potyviruses and cytoplasmic inclusions from the same tissue. *Journal of Virological Methods* 20 : 203 - 217.
- Hammond, J. 1992. Potyvirus serology, sequence and biology. *Archives of Virology*[Supplement] 5: 123-138.
- Higgins, C.M., Cassidy, B.G., Teycheney, P.-Y., Wongkaew, S. and Dietzgen, R.G. 1998. Sequences of the coat protein gene of five peanut stripe virus (PSTV) strains from Thailand and their evolutionary relationship with other bean common mosaic virus sequences. *Archives of Virology* 143 : 1655-1667.
- Higgins, C.M., Dietzgen, R.G., Mat Akin, H., Sudarsono, Chen, K. and Xu, Z. 1999. Biological and molecular variability of peanut stripe potyvirus. *Current Topics in Virology* 1: 1-25.
- Khan, J.A., Lohuis, H., Goldbach, R.W. and Dijkstra, J. 1993. Sequence data to settle the taxonomic position of bean common mosaic virus and blackeye cowpea mosaic virus isolates. *Journal of General Virology* 74 : 2243-2249.
- Lain, S., Riechmann, J.I. and Garcia, J.A. 1989. The complete nucleotide sequence of plum pox potyvirus RNA. *Virus Research* 13: 157-172.

- Lawson, C., Kaniewski, W., Haley, L., Rozman, R., Newell, C., Sanders, P. and Turner, N.E. 1990. Engineering resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar: resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic plants. *Bio/Technology* 8 : 127-134.
- Pappu, S.S., Pappu, H.R., Chang, C.A., Culbreath, A.K. and Todd, J.W. 1998. Differentiation of biologically distinct peanut stripe potyvirus strains by a nucleotide polymorphism-based assay. *Plant Disease* 82 : 1121-1125.
- Powell-Abel, P., Nelson, R.S., and De, B. 1996. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232: 738-743.
- Robaglia, C., Durand-Tardif, M., Tronchet, M., Boudazin, G., Astier-Manifacier, S. and Casse-Delbart, F. 1989. Nucleotide sequence of potato virus Y (N) strain genomic RNA. *Journal of General Virology* 70: 935-947.
- Rybicki, E.P. and Shukla, D.D. 1992. Coat protein phylogeny and systematics of potato viruses. In Barnette, O.W.(ed.), *Potyvirus Taxonomy*. Springer, Wein and New York. *Archives of Virology* [Supplement] 5], pp. 139-170.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 74: 5463-5467.
- Shukla, D.D. and Ward, C.W. 1988. Amino acid sequence homology of coat proteins as a basis for identification and classification of the potyvirus group. *Journal of General Virology* 69: 2703-2710.
- Shukla, D.D. and Ward, C.W. 1989. Identification and classification of potyviruses on the basis of coat protein sequence data and serology. *Archives of Virology* 106: 171-200.
- Shukla, D.D., Ward, C.W. and Brunt, A.A. 1994. *The Potyviridae*. CAB International, Cambridge.
- Siriwong, P. 1995. Characterization and cDNA cloning of chilli vein-banding mottle virus, a new potyvirus. Ph.D. Thesis. Tokyo University of Agriculture, Japan.
- Siriwong, P., Kittipakorn, K. and Ikegami, M. 1995. Characterization of chilli vein-banding mottle virus isolated from pepper in Thailand. *Plant Pathology* 44: 718-727.

- Teycheney, P.-Y. and Dietzgen, R.G. 1994. Cloning and sequence analysis of the CP gene of an Australian strain of peanut mottle and Indonesian "blotch" strain of peanut stripe potyvirus. *Virus Research* 31: 235-244.
- Thomson, K.G., Dietzgen, R.G., Gibbs, A.J., Tang, Y.C., Liesak, W., Teakle, D.S. and Stackebrandt, E. 1995. Identification of zucchini yellow mosaic potyvirus by RT-PCR and analysis of sequence variability. *Journal of Virological Methods* 55:83-96.
- Turpen, T. 1989. Molecular cloning of a potato virus Y genome: nucleotide sequence homology in non-coding regions of potyviruses. *Journal of General Virology* 70: 1951- 1960.
- Verdi, E., Sela, I., Edlbaum, O., Livneh, O., Kuxnetsova, L., and Stram, Y. 1993. Plant transformed with a cistron of a potato virus Y protease (Nia) are resistant to virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 90: 7513-7517.
- Wongkaew, S. and Dollet, M. 1990. Comparison of peanut stripe virus isolate using symptomatology on particular hosts and serology. *Oleagineux* 45: 267-278.

gene, M. Buchholz
 100-1000 bp, 10-57
 1000 bp, 1000 bp,
 1000

M. Buchholz
 1000 bp, 1000 bp,
 1000 bp, 1000 bp,
 1000

1000 bp, 1000 bp,
 1000 bp, 1000 bp,
 1000 bp, 1000 bp,
 1000

1000

1000 bp, 1000 bp,
 1000 bp, 1000 bp,
 1000 bp, 1000 bp,
 1000

1000 bp, 1000 bp,
 1000 bp, 1000 bp,
 1000 bp, 1000 bp,
 1000

1000 bp, 1000 bp,
 1000 bp, 1000 bp,
 1000 bp, 1000 bp,
 1000

Out put ที่ได้รับ

1. **Siriwong, P. , Chiemsombat, P., Wongkaew, S. and Ikegami, M.** Nucleotide sequence of Nib protein and coat protein genes of peanut stripe virus strain T6-97 isolated from peanut in Thailand. **Peanut stripe virus polyprotein gene, partial cds.** GenBank accession number **AF073380** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

2. **Siriwong, P, Chiemsombat, P., Wongkaew, S. and Ikegami, M.** Partial nucleotide sequence of coat protein gene of peanut stripe virus-severe necrotic strain isolated from peanut in Thailand. **Peanut stripe virus coat protein gene, partial cds.** GenBank accession number **AF079116** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

3. **Siriwong, P. , Chiemsombat, P., Wongkaew, S. and Ikegami, M.** Biological and Molecular properties of a severe necrotic strain of peanut stripe Potyvirus from Thailand. **Peanut stripe virus severe necrotic strain polyprotein gene, partial cds.** GenBank accession number **AF191748** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

4. **Siriwong, P. and Chiemsombat, P.** Biological and Molecular properties of a severe necrotic strain of peanut stripe Potyvirus from Thailand **Peanut stripe virus clone SN-Nib2 pol protein(pol)gene , partial cds.** GenBank accession number **AF200623** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

5. **Siriwong, P. and Chiemsombat, P.** Nucleotide sequence of Nib and coat protein genes and 3' non-coding region of peanut stripe virus-severe necrotic strain from Thailand. , **Peanut stripe virus clone SN-Nib3 pol protein(pol)gene , partial cds.** GenBank accession number **AF200634** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

6. อภิเดช แสงดี . 2542. การเปรียบเทียบเชื้อ peanut stripe *Potyvirus* สองไอโซเลตที่ทำให้เกิดอาการเนื้อเยื่อตายบนถั่วลิสง และพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อโดยเทคนิคกรดนิวคลีอิกไฮบริไดเซชัน (Comparison on two necrotic isolates of peanut stripe *Potyvirus* and development of detection method by nucleic acid hybridization techniques. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น ISBN 974-676-631-7 (ดร.เพชรรัตน์ ศิริวงศ์ เป็นประธานกรรมการวิทยานิพนธ์)

Out put

1. Nucleotide sequence of Nlb protein and coat protein genes of peanut stripe virus strain T6-97 isolated from peanut in Thailand. GenBank accession number **AF073380**

LOCUS AF073380 1191 bp RNA VRL 23-JUL-1998

DEFINITION Peanut stripe virus polyprotein gene, partial cds.

ACCESSION AF073380

VERSION AF073380.1 GI:3335562

KEYWORDS -

SOURCE Peanut stripe virus.

ORGANISM Peanut stripe virus
 Viruses: ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage: Potyviridae: Potyvirus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1191)

AUTHORS Siri Wong.P., Chiemsombat.P., Wongkaew.S. and Ikegami.M.

TITLE Nucleotide sequence of Nlb protein and coat protein gene of peanut stripe virus strain T6-97 isolated from peanut in Thailand

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1191)

AUTHORS Siri Wong.P.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (20-JUN-1998) Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Muang. Khon Kaen 40002, Thailand

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1191
 /organism="Peanut stripe virus"
 /strain="T6-97"
 /specific_host="Arachis hypogaea; variety Tainan 9"
 /db_xref="taxon:28353"
 /note="causes necrosis and stripe symptoms on leaves"

CDS <1..990
 /codon_start=1
 /product="polyprotein"

/protein_id="AAC27302.1"

/db_xref="GI:3335563"

/translation="YIAESALKTL YTNKGTRIEELAKYLAVLDFDYEVGCGESVHLQS

GSSTQPPVVDAGVDTGKDEKEKSNKGKGSSESSESGNTSRGTENQSMRDKDVNAGSRG
KVVPRQLQKITKKMNLPMVKGNVILNLDHLLDYKPEQTDLFNTRATKMQFEMWYNAVKG
EYEIDDEQMSIVMNGFMVWCIDNGTSPDVNGAWVMMDGDEQVEYPLKPMVENAKPTLR
QIMHHFSDAAEAYIEMRNSEQPYMPRYGLLRNLRDKNLSCYAFDFYEVTSKTSGRARE
AVAQLKAAALSNVNSKLFGLDGNVATTSENERHTARDVNQNMHTLLGMGSAQ"

mat_peptide <1..129

/product="Nlb protein"

mat_peptide 130..987

/product="coat protein"

3'UTR 991..1191

BASE COUNT 379 a 208 c 309 g 295 t

ORIGIN

```

1  tacatagcag aatcagcact caaacacatt tacaccaaca aaggacaag aattgaagag
61  ttggcaaatg atttggcoogt gottgatttt gattatgaag ttggatgttg agaactctgtg
121 catctacaat cagggagcag cacacaacca ccagtgggtg atgctggcgt ggatactggc
181 aaggatgaga aagagaagag caataaagga aaaggetctg aaagcagtga aggatcagggc
241 aacactagcc gtggaacaga gaatcagtcg atgagagaca aggatgtgaa tgcctggttca
301 agaggaaagg ttgttcoctog gtttcagaag atcacaaga aatgaattt gccaatgggtg
361 aaagggaatg tgatcttgaa ttggaccat ctgttagatt acaagccaga gcaactgat
421 cttttcaaca caagagcaac aaagatgcag ttgaaatgt ggtacaatgc tgtgaagggc
481 gagtatgaga tagatgatga acagatgtcg attgtgatga atggctttat ggtgtggtgt
541 attgacaatg gcacttcacc agatgtgaat ggagcatggg tgatgatgga tggagatgag
601 caagtggat atoctctcaa accaatggtt gagaatgcaa aaccaacact tcgtcaaatc
661 atgcaccatt tctcagatgc agctgaagca tatattgaga tgagaaatte cgaacagccg
721 tacatgccta ggtacggatt gttcggat ttgagggaca aaaatttaag ctgctacgct
781 ttgactttct atgaagtaac ttctaagaca tcgggcogtg caagggaagc agtagcadag
841 ttgaaggcag cagccctcag caatgttaac agcaagttgt ttggacttga tgggaatgtg
901 gcaacaacca gcagaaatgc tgaagggcac accgcaaggg aogtcaatca gaacatgcat
961 acactttctg gcatgggttc tgccagtag agattgggtc aactgatcac agttagaatc
1021 tcgctgctgc gaataatttc atatagtagt cctttatgtt ctctttagtt tcagtgtggt
1081 tttaccacca ttgtctaac atgtgtatag tgtggttggg ccaccaacat attgtgagta
1141 ctttatgttt atgagtaagc cggaagaacc attgcaatgg cgagggcatg c

```

//

2. Partial nucleotide sequence of coat protein gene of peanut stripe virus-severe necrotic strain isolated from peanut in Thailand. GenBank accession number **AF079116**

LOCUS AF079116 665 bp RNA VRL 04-AUG-1998

DEFINITION Peanut stripe virus coat protein gene, partial cds.

ACCESSION AF079116

VERSION AF079116.1 GI:3386535

KEYWORDS

SOURCE Peanut stripe virus.

ORGANISM *Peanut stripe virus*

Viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage; Potyviridae; Potyvirus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 665)

AUTHORS Siri Wong, P., Chiemsombat, P., Wongkaew, S. and Ikegami, M.

TITLE Partial nucleotide sequence of coat protein gene of peanut stripe virus-severe necrotic strain isolated from peanut in Thailand

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 665)

AUTHORS Siri Wong, P.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (18-JUL-1998) Dept. of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Mittrapab Road, Muang, Khon Kaen 40002, Thailand

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..665

/organism="Peanut stripe virus"

/strain="severe necrotic"

/db_xref="taxon:28353"

CDS <1..>665

/codon_start=1

/product="coat protein"

/protein_id="AAC28385.1"

/db_xref="GI:3386536"

/translation="VPRLQKITKKMNLPMVKGNVILNLDHLLDYKPEQTDLFNTRATK
 MQFEMWYNAVVKVEYEIDDEQMSIVMNGFMVWCIDNGTSPDVNGTWVMMMDGD
 EQVEYPLKPMVENAKPTLRQIMHHFSDAAEAYIEMRNSERPYPMPRYGLLRNLRD
 KNLARYAFDFYEATSKTSDRAREAVAQMKAALSNVNSKLFGLDGNVATTSEN
 TERHTAKDVNQNMHTLLGMG"

BASE COUNT 223 a 121 c 162 g 159 t

ORIGIN

```

1  gtcccacggc  ttcaaaagat  cacaagaaa  atgaatttgc  caatggtgaa  agggaatgtg
61  atcttgaatt  tagaocatct  gttagattac  aagccagagc  aaactgatct  tttaaacaca
121 agagcaacaa  agatgcagtt  tgaantgtgg  tacaatgctg  tgaaggatga  gtatgaaata
181 gatgatgaac  agatgtcaat  tgtgatgaat  ggctttatgg  tgtggtgtat  tgacaatggc
241 acttoaccag  atgtgaatgg  aacatgggtg  atgatggatg  gagatgagca  agtggaatat
301 cctctcaaac  caatggttga  aaatgcaaaa  coaacacttc  gtcaaatcat  gcaccatttc
361 tcagatgcag  ctgaagcata  tattgagatg  agaaattctg  aacgacogta  catgocctagg
421 taoggattgc  ttoggaattt  gagggataaa  aatctagctc  gctacgcttt  ogaottotat
481 gaagcaactt  ctaagacatc  agatogtgca  agggaagcag  tagcacagat  gaaggcagca
541 gccttcagca  atgttaacag  caagttgttt  ggaattgatg  ggaatgtggc  aacaaocagc
601 gagaatactg  aaaggcacac  tgcaaggac  gtcaatcaga  acatgcacac  acttcttggc
661 atggg //

```

3. Biological and Molecular properties of a severe necrotic strain of peanut stripe Potyvirus from Thailand. **GenBank** accession number **AF191748**

LOCUS AF191748 1176 bp RNA VRL 01-NOV-2000

DEFINITION Peanut stripe virus severe necrotic strain polyprotein gene.partial cds.

ACCESSION AF191748

VERSION AF191748.1 GI:11065909

KEYWORDS

SOURCE Peanut stripe virus.

ORGANISM *Peanut stripe virus*

Viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage; Potyviridae; Potyvirus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1176)

AUTHORS Siri Wong.P., Chiemsombat.P., Wongkaew.S. and Ikegami.M.

TITLE Biological and molecular properties of a severe necrotic strain of peanut stripe Potyvirus from Thailand

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1176)

AUTHORS Siri Wong.P., Chiemsombat.P., Wongkaew.S. and Ikegami.M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (04-OCT-1999) Plant Pathology, Faculty of Agriculture,Khon Kaen University, Mittrapab Road, Muang, Khon Kaen 40002.Thailand

FEATURES Location/Qualifiers

Source 1..1176

/organism="Peanut stripe virus"

/specific_host="Arachis hypogaeae"

/db_xref="taxon:28353"

/country="Thailand"

/note="severe necrotic strain"

CDS <1..989

/codon_start=3

/product="polyprotein"

/protein_id="AAG28388.1"

/db_xref="GI:11065910"

/translation="IAESALKTLTYTNKGTRIEELAKYLAVLDFDYEVGCGESVHLQSG

SSTQPPVVDAGVDTGKDEKEKSNKGKGSSESESGNTSRGTENQSMRDKDVNAGSRGK

VVPRLQKITKKMNLPMVKGNVILNLDHLLDYKPEQTDLFNTRATKMQFEMWYNAVKE

YEINDEQMSIVMNGFMVWCIDNGTSPDVNGTWVMMDGDEQVEYPLKPMVENAKPTLRQ

IMHHFSDAAEAYIEMRNSERPYPMPRYGLLRNLRDKNLARYAFDFYEVTSKTSRAREA

VAQMKAAALSNNVNSKLFGLDGNVATTSEHTARDVNQNMHTLLGMGSAQ"

mat_peptide <1..131

/note="Nlb"

/product="RNA polymerase"

mat_peptide 132..986

/note="CP"

/product="coat protein"

3'UTR 990..1176

BASE COUNT 382 a 204 c 298 g 292 t

ORIGIN

```

1  acatagcaga atcagcactc aaaacacttt acaccaacaa aggaacaaga attgaagagt
61  tggcaaagta tttggcogtg cttgattttg attatgaagt tggatgtgga gaatctgtgc
121 atctacaatc agggagcagc acacaaccac cagtgggtga tgctggogtg gatactggca
181 aggatgagaa agagaagagc aataaaggaa aaggctctga aagcagtga ggatcaggca
241 acactagccg tggaacagag aatcagtc aa tgagagacaa ggatgtgaat gctggttcaa
301 gaggaaggt tgttctctgg cttcagaaga tcacaaagaa aatgaatttg coaatgggtga
361 aagggaatgt gatcttgaat ttggaccatc tgttagatta caagccagag caaactgato
421 ttttcaacac aagagcaaca aagatgcagt ttgagatgtg gtacaatgot gtgaaggog
481 agtatgagat aaatgatgaa cagatgtcaa ttgtgatgaa tggotttatg gtgtggtgta
541 ttgacaatgg cacttcacca gatgtgaatg gaacatgggt gatgatggat ggagatgago
601 aagtggaata toctctcaaa ccaatgggtg agaatgcaaa accaacaactt cggcaaatca
661 tgcaccattt ctcagatgca gctgaagcat atattgagat gagaatttcc gaaogacogt
721 acatgcctag gtaoggattg cttcggaatt tgagggacaa aatttttagct cgetacgett
781 togacttcta tgaagtaacc tctaagacat cagatcgtgc aagggaagca gtagoacaga
841 tgaaggcagc agccctcagc aatgttaaca gcaagttgtt tggacttgat ggggaatgtg
901 caacaaccag cgagaatact gaaaggcaca ctgcaaggga cgtcaatcag aacatgcata
961 cacttcttgg catgggttct ggcagtaga gattgggtca actgatcaca gttagaatct
1021 cgogtogota aataatttca tatagtagtc ttttatgttc tctttagttt cagtgtggtt
1081 ttaccaacat tgtotaacta ttgtgatagt gtggttggtc caaccaacata ttgtgagtac
1141 tttatgttta taagtaagcc ggaagaacca ttgcaa

```

//

4. Biological and Molecular properties of a severe necrotic strain of peanut stripe Potyvirus from Thailand. **GenBank** accession number **AF200623**

LOCUS	AF200623 1765 bp	RNA	VRL	01-NOV-2000
DEFINITION	Peanut stripe virus clone SN-Nib2 pol protein (pol) gene, partial cds.			
ACCESSION	AF200623			
VERSION	AF200623.1 GI:11066405			
KEYWORDS				
SOURCE	Peanut stripe virus.			
ORGANISM	<u>Peanut stripe virus</u>			
	Viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage; Potyviridae; Potyvirus.			
REFERENCE	1 (bases 1 to 1765)			
AUTHORS	Siriwong.P., Chiemsombat.P., Wongkaew.S. and Ikegami.M.			
TITLE	Biological and Molecular properties of a severe necrotic strain of peanut stripe Potyvirus from Thailand JOURNAL Unpublished			
REFERENCE 2	(bases 1 to 1765)			
AUTHORS	Siriwong.P. and Chiemsombat.P.			
TITLE	Nucleotide sequence of 3' terminal genome of peanut stripe Potyvirus-severe necrotic strain JOURNAL Unpublished			
REFERENCE 3	(bases 1 to 1765)			
AUTHORS	Siriwong.P. and Chiemsombat.P.			
TITLE	Direct Submission JOURNAL Submitted (30-OCT-1999) Plant Pathology, Dept. of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Mittrapab Road, Muang, Khon Kaen 40002, Thailand			
FEATURES	Location/Qualifiers			
source	1..1765			
	/organism="Peanut stripe virus"			
	/strain="severe necrotic strain"			
	/db_xref="taxon:28353"			
	/clone="SN-Nib2"			
gene	<1..1495			
	/gene="pol"			

mat_peptide <1..634
 /gen="pol"
 /note="Nlb: RNA polymerase"
 /product="nuclear inclusion protein b"

CDS <1..1495
 /gene="pol"
 /codon_start=2
 /product="pol protein"
 /protein_id="AAG28575.1"
 /db_xref="GI:11066406"

/translation="GNNSGQPSTVVDNTLMVVM SVYY SCHKVGWSEDIQERLVFFAN
 GDDIILSVQETDLWVLD TFTK SFGELGLNYDFSERTRKREDLWFM SHCAIQVDGIYIPKLEP
 ERVVSILEWDRSKEMMHRTEAICAAMIEAWGYPELLQEIRKFYLLERDELRE
 IAASGGAPYIAESALKTLYTNKGTRIEELAKYLA VLDFDYEVGCGESVHLQSGSSTQP
 PVVDAGVDTGKDEKEKSNKGKGSSESSESGNTSRGTENQSMRDKDVNAGSRGKVVPR
 LQKITKKMNLPMVKGNVILNLDHLLDYKPEQTDLFNTRATKMQFEMWYNAVKGEYEIND
 EQMSIVMNGFMVWCIDNGTSPDVNGTWVMMDGDEQVEYPLKPMVENAKPTLRQIMHFF
 SDAAEAYIEMRNSERPYPYGLLRNLRDKNLARYAFDFYEVTSKTS DRAREAVAQMK
 AAALSNVNSKLFGLDGNVATTSENERHTARDVNQNMHTLLGMGSAQ"

mat_peptide 635..1492
 /gene="pol"
 /product="coat protein"

3'UTR 1496..1765

BASE COUNT 560 a 304 c 454 g 447 t

ORIGIN

```

1  gggtaataac agtgggcaac ctccacagt cgtggacaac acactcatgg ttgttatgtc
61  agtgtattat tcatgtcaca aagtgggctg gagtgatgaa gacatccagg agcgtttggt
121  tttotttgco aatggggatg acatcatact ttctgtgcaa gagaaggatc tctgggtctc
181  tgacacattt accaaatcat ttggagaact tggcctgaat tatgacttca gtgagagaa
241  aagaaagagg gaagatctct ggttcattgt acactgtgog attcaagttg atggaatata
301  tattccaaaa ttgaaccag agcgtgttgt ttcaatccta gaggggata ggagcaaaga
361  aatgatgcac aggaactgaag caatctgtgc agcaatgatt gaagcatggg gctatcttga
421  attgtcccaa gaaattagaa aattttattt gtggttgctt gagagggag agctcagaga
481  gattgcagcc agtggaggag ctocatacat agcagaatca gcactcaaaa cactttacac
541  caacaaagga acaagaattg aagagttggc aaagtatttg googtgcttg attttgatta
601  tgaagttgga tgtggagaat ctgtgcactc acaatcaggg agcagcacac aaccaccagt
661  ggtggatgct ggogtggata ctggcaagga tgagaaagag aagagcaata aaggaaaagg
721  ctctgaaagc agtgaaggat caggcaacac tagccgtgga acagagaatc agtcaatgag
```

```

781 agacaaggat gtgaatgctg gttcaagagg aaaggttggt cctoggett cagaatcac
841 aaagaaaatg aatttgccaa tggtgaaagg gaatgtgato ttgaatttgg accatctgtt
901 agattacaag ccagagcaaa ctgatotttt caacacaaga gcaacaaaga tgcagtttga
961 gatgtggtac aatgctgtga agggcgagta tgagataaat gatgaacaga tgtcaattgt
1021 gatgaatggc tttatggtgt ggtgtattga caatggcact tcaccagatg tgaatggaac
1081 atgggtgatg atggatggag atgagcaagt ggaatatctt ctcaaaccaa tggttgagaa
1141 tgcaaaaacca acacttcggc aaatcatgca ccatttctca gatgcagctg aagcatatat
1201 tgagatgaga aattcogaac gaccgtacat gcctaggtac ggattgcttc ggaatttgag
1261 ggacaaaaat ttagctogct acgctttoga ctttatgaa gtaacctcta agacatcaga
1321 tegtgaagg gaagcagtag cacagatgaa ggcagcagcc ctacgaatg ttaacagcaa
1381 gttgtttgga cttgatggga atgtggcaac aaccagcgag aatactgaaa ggcacactgc
1441 aagggaactc aatcagaaca tgcatacact tcttggcatg ggttctgccc agtagagatt
1501 gggtaactc atcacagtta gaatctogcg tcgtaaaata attcatata gtagtctttt
1561 atgttctctt tagtttcagt gtggttttac caccattgtc taactattgt gatagtgtgg
1621 ttggtccacc aacatattgt gagtacttta tgtttataag taagccggaa gaaccattgc
1681 aatgggtgagg acgtgcagag tgattctatc acgtgtcatg gggtagctac ggcaatgott
1741 gttgtgocaa aaaaaaaaa aaaaa //

```

5. Nucleotide sequence of Nib and coat protein genes and 3' non-coding region of peanut stripe virus-severe necrotic strain from Thailand.

GenBank accession number AF200634

LOCUS	AF200624 2793 bp RNA VRL 0 1-NOV-2000
DEFINITION	Peanut stripe virus clone SN-Nib3 pol protein (pol) gene, partial cds.
ACCESSION	AF200624
VERSION	AF200624.1 GI:11066407
KEYWORDS	
SOURCE	Peanut stripe virus.
ORGANISM	<i>Peanut stripe virus</i> Viruses: ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage: Potyviridae; Potyvirus.
REFERENCE	1 (bases 1 to 2793)
AUTHORS	Siriwong.P. and Chiemsombat.P.
TITLE	Nucleotide sequence of 3' terminal genome of peanut stripe Potyvirus-severe necrotic strain JOURNAL Unpublished REFERENCE 2 (bases 1 to 2793)
AUTHORS	Siriwong.P., Chiemsombat.P., Wongkaew.S. and Ikegami.M.
TITLE	Biological and Molecular properties of a severe necrotic strain of peanut stripe Potyvirus from Thailand JOURNAL Unpublished
REFERENCE 3	(bases 1 to 2793)
AUTHORS	Siriwong.P. and Chiemsombat.P.
TITLE	Direct Submission
JOURNAL	Submitted (30-OCT-1999) Plant Pathology, Dept. of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Mittrapab Road, Muang, Khon Kaen 40002, Thailand
FEATURES	Location/Qualifiers
source	1..2793 /organism="Peanut stripe virus" /strain="severe necrotic strain" /db_xref="taxon:28353" /clone="SN-Nib3"
gene	<1..2523

/gene="pol"
 CDS <1..2523
 /gene="pol"
 /codon_start=1
 /product="pol protein"
 /protein_id="AAG28576.1"
 /db_xref="GI:11066408"

/translation="QPDKIAWGSLNLVSDQLKEEFKVS KLISDLFGGT VATQSKQQWV
 LESAEGLKACARADSALVTKHVVKGKCPYFEQYLRERSEAAFFKPLMGAYQPSKLN
 KEAFKKDFFKYNKVILNEVCHEAFAAFNGVVRMMMEHGFSECSYVTD PDEIYSSLN
 LKAAVGAQYKGGKQDYLCMDDEFNKERLLYLSCERLFYGGKGLWNGSLKAE LRPLEKV
 EANKTRTFTAAPIDTLLGAKVCVDDFNNQFYSNL ECPWTVGMTKFYGGWDTLMRKL P
 DGWIYCHADGSQFDSSLTPLLNSVLGIRRFMEDWVVG EEMLENLYAEIVYTPILTP
 DGTVFKKFRGNNSGQPSTVVDNTLMVVM SVYYSCHKVGWSDEDIQERLVFFANGDDII
 LSVQETDLWVLDFTTKSFGELGLNYDFSERTRKREDLWFMSHCAIQVDGIYIPKLEPE
 RVVSILEWDRSKEMMHRTEAICAAMIEAWGYPELLQEIRKFYLWLLERDELREIAASG
 GAPYIAESALKTL YTNKGTRIEELAKYLAVLDFDYEVGCGESVHLQSGSSTQPPVVDA
 GVDTGKDEKEKSNKGKGSSESSESGNTSRGTENQSMRDKDVNAGSRGKVVPRLQKITK
 KMNLP MVKGNVILNLDHLLDYKPEQTDLFNTRATKMQFEMWYN AVKGEYEINDEQMSI
 VMNGFMVWCIDNGTSPDVNGTWVMMDGDEQVEYPLKPMVENAKPTLRQIMHHFSDAAE
 AYIEMRNSERPYPMPRYGLLRNLRDKNLARYAFDFYEVTSKTS DRAREAVAQMKAAL S
 NVNSKLFGLDGNVATTSENERHTARDVNQNMHTLLGMGSAQ"

mat_peptide <1..114
 /gene="pol"
 /note="Nla"
 /product="nuclear inclusion protein a"

mat_peptide 115..1662
 /gene="pol"
 /note="Nlb; RNA polymerase"
 /product="nuclear inclusion protein b"

mat_peptide 1663..2520
 /gene="pol"

/product="coat protein"

3'UTR

2524..2793

BASE COUNT

881 a 481 c 711 g 720 t

ORIGIN

```

1 caaccocgaca aaatagcttg ggggttcattg aatcttggtta gtgatcagct aaaagaagaa
61 ttcaaagttt caaaacttat ctocagatctt tttgggtggca cagtggcaac acagagcaag
121 cagcagtggtg ttttgagtc ogtgaagggc aatctaaagg catgocgaag agctgacagc
181 gcattggtta caagcatgt tgtgaagggc aagtgtccat actttgagca gtacttgaga
241 gagoggagtg aagcagctgc attottcaag cctttgatgg gtgcatacca aocaaagcaaa
301 cttacaagg aagcatttaa gaaagacttc ttcaaataca acaaagttgt aatactgaat
361 gaagtttgcc atgaagcgtt tgaagcagct ttcaatgggt ttgtgaggat gatgatggag
421 caoggttttt ctgagtgttc ttatgtaaca gaocagatg aatatactc atcattgaac
481 ctgaaggcag cagtggagc acaatacaaa gggaaaaagc aggactatct ttgtgatatg
541 gatgaattca acaaggaaag acttttgtac ctgagttgtg agagattgtt ctatggcaag
601 aaagggcttt ggaatggttc ttggaaggca gagttgaggc cattagagaa ggttgaggct
661 aacaaaacac gtacottcac agctgtctcc attgatacat tacttgagac aaaggtttgt
721 gtggatgatt tcaacaacca attttatagt ctcaacttgg aatgcccatg gactgtaggg
781 atgacaaaat tctatggagg atgggacacc ctaatgagaa agttgcctga tgggtggatt
841 tattgtcatg cagatggttc acaatttgat agttcgttaa caccactcct cctcaactca
901 gtocctggga tcagaagatt ottcatggag gattggtggg ttggtgaaga gatgottgaa
961 aatctgtatg ctgagattgt gtacacacct atactaacac cagatggaac agtgttttaa
1021 aagttcaggg gaaacaacag tggacaacct tccacagtog tggacaacac auctatgggt
1081 gttatgtcag tgtattatc atgtcacaaa gtgggctgga gtgatgaaga catccaggag
1141 cgtttggttt tctttgocaa tggggatgac atcatacttt ctgtgcaaga gaoggatctc
1201 tgggtccttg acacatttac caaatcattt ggagaacttg gcttgaatta tgaottcagt
1261 gagagaacaa gaaagagggg agatctctgg ttcattgtcc actgtgcgat tcaagttgat
1321 ggaatatata ttocaaaatt agaaccagag cgtgttgttt caatctaga gtgggatagg
1381 agcaaaagaa tgatgcacag gactgaagca atctgtgcag caatgattga agcatggggc
1441 tatctgaat tcttccaaga aattagaaaa tttatttgt ggttgcttga gagggacgag
1501 ctacagagaga ttgcagccag tggaggagct ccatacatag cagaatoagc actcaaaaca
1561 ctttacacca acaagggaac aagaattgaa gagttggcaa agtatttggc cgtgttgtat
1621 tttgattatg aagttggatg tggagaatct gtgcattctac aatcaggggg cagcacacaa
1681 ccaccagtggt tggatgotgg cgtggatact ggaaggatg agaaagagaa gagcaataaa
1741 ggaagggtct ctgaagcag tgaaggatca ggcacacta gcogtggaac agagaatcag
1801 tcaatgagag acaaggatgt gaatgotggt tcaaggaggaa aggttgttcc tgggttcag
1861 aagatcacaa agnaaatgaa tttgccaatg gtgaaagggg atgtgatott gaatttggac
1921 catctgttag attacaagcc agagcaaaact gatottttca acacaagagc aacaaagatg
1981 cagtttgaga tgtggtacaa tctgtgtaag ggogagtatg agataaatga tgaacagatg
2041 tcaattgtga tgaatggott tatggtgtgg tgtattgaca atggcacttc accagatgtg
2101 aatggaacat ggtgtgatgat ggttggagat gagcaagtgg aatatcctct caaocaaatg
2161 gttgagaatg caaaaccaac acttoggcaa atcatgcacc atttctcaga tgcagctgaa
2221 gcataatatt agatgagaaa ttocgaacga cgtacatgc ctaggtaagg attgcttogg
2281 aatttgaggg acaaaaattt agctogctac gotttlogact tctatgaagt aacctctaag
2341 acatcagatc gtgcaagggg agcagtagca cagatgaagg cagcagccct cagcaatgtt
2401 aacagcaagt tgtttggact tgatgggaat gtggcaacaa ccagogagaa tactgaaggg
2461 cacactgcaa gggacgtcaa tcagaacatg catacacttc ttggcatggg ttctgocgag
2521 tagagattgg gtcaactgat cacagttaga atctcogctc gctaaataat ttcatatagt
2581 agtcttttat gttctcttta gtttcagtgt ggttttacca ccattgtcta actattgtga
2641 tagtgtggtt ggtccaccaa catattgtga gtaactttatg tttataagta agcoggaaga
2701 accattgcaa tgggtgaggac gtgcagagtg attctatcac gtgtcatggg gtgactaagg
2761 caatgcttgt tgtgccaaaa aaaaaaanaa aaa //

```

6. ส่วนหนึ่งของสารเคมีวัสดุอุปกรณ์และโคลนของเชื้อ PSIV-SN ที่ได้รับจากโครงการวิจัยนี้ได้นำไปสนับสนุนการทำวิจัยวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท จำนวน 1 เรื่อง คือ

ชื่อวิทยานิพนธ์ : การเปรียบเทียบเชื้อ peanut stripe *Potyvirus* สองไอโซเลตที่ทำให้เกิดอาการเนื้อเยื่อตายบนถั่วลิสง และพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อโดยเทคนิคการดิวคัลลิคไฮบริไดเซชัน (Comparison on two necrotic isolates of peanut stripe *Potyvirus* and development of detection method by nucleic acid hybridization techniques)

โดย: นายอภิเดช แสงดี

อ้างอิง: วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ. 2542

ISBN 974-676-631-7

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติด้านชีววิทยาและซีรัมวิทยาของเชื้อ peanut stripe *Potyvirus* (PSIV) ที่ทำให้เกิดอาการเนื้อเยื่อตาย 2 ไอโซเลต คือ PSIV-SN และ PSIV-T6/97 และพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคการดิวคัลลิคไฮบริไดเซชัน ซึ่งผลการศึกษาพบว่าเชื้อทั้งสองไอโซเลตมีพืชอาศัยชนิดเดียวกันอยู่ใน 4 ตระกูล คือ Chenopodiaceae, Pedaliaceae, Solanaceae และ Leguminosae แต่มีความแตกต่างในลักษณะอาการของโรคขึ้นอยู่กับชนิดและพันธุ์พืช ระดับความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อทั้งสองไอโซเลตบนถั่วลิสงพันธุ์โทนาน 9 มีความสัมพันธ์กับอายุของพืช โดยถั่วลิสงพันธุ์โทนาน 9 ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 1 และ 2 สัปดาห์หลังจากงอกแสดงอาการของโรครุนแรงกว่าที่อายุ 3 และ 4 สัปดาห์ ทั้งนี้เชื้อ PSIV-SN ทำให้เกิดอาการรุนแรงกว่า PSIV-T6/97 ในทุกช่วงอายุของพืชที่ทดสอบ เชื้อทั้งสองไอโซเลตชักนำให้เกิดการสร้าง amorphous inclusion bodies ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ที่ติดเชื้อ ลักษณะของ inclusion bodies ที่พบในใบพืชที่เชื้อ PSIV-T6/97 เข้าทำลาย มีหลายลักษณะผ่านแปรไปตามพันธุ์ของถั่วลิสง ส่วน inclusion bodies ของเชื้อ PSIV-SN มีความคงที่โดยพบลักษณะค่อนข้างกลมเนื้อละเอียดอยู่ใกล้กับนิวเคลียสของเซลล์

เชื้อ PSIV ทั้งสองไอโซเลตสามารถแยกสกัดได้จากใบถั่วลิสงเป็นโรคได้เป็นผลสำเร็จ วิธีการนี้สามารถได้อนุภาคไวรัส 8.92 มิลลิกรัม และ 9.44 มิลลิกรัมไวรัสต่อใบพืชเป็นโรค 100 กรัม สำหรับเชื้อ PSIV-SN และ PSIV-T6/97 ตามลำดับเริ่มจากการบดใบพืชที่แช่แข็งไว้ใน 0.5 M potassium phosphate buffer pH 7.7 กวนน้ำคั้นร่วมกับ 10 % (v/v) chloroform, และตกตะกอนอนุภาคไวรัสด้วย 8% PEG (MW 600) หลังจากนั้นนำสารละลายตะกอนไวรัสไปปั่นเหวี่ยงใน 40% sucrose cushion นำสารละลายไวรัสที่บริสุทธิ์ไปทำให้บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นด้วยการปั่นเหวี่ยงบนสารละลายน้ำตาลต่างระดับ (10-40% sucrose)

นำสารละลายไวรัสบริสุทธิ์ PSIV-SN และ PSIV-T6/97 ไปฉีดในกระต่ายสีขาวเพื่อผลิตแอนติซีรัม โดยแอนติซีรัมต่อเชื้อ PSIV-SN และ PSIV-T6/97 ที่ผลิตได้มี titer 1:16,000 และ 1:10,000 ตามลำดับโดยวิธี indirect-ELISA สามารถตรวจหาเชื้อ PSIV-SN และ PSIV-T6/97 บริสุทธิ์โดยวิธี indirect-ELISA ได้ที่ระดับ 40 และ 30-40 นาโนกรัมของไวรัสตามลำดับ แอนติซีรัมต่อเชื้อ PSIV-SN และ PSIV-

T6/97 ที่ผลิตได้มีความสัมพันธ์ทางซีรุ่มวิทยาแบบใกล้ชิดมากกับ PSIV ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ (T2, T3, T4, T5, T7 และ T8) และมีความสัมพันธ์แบบห่างกับเชื้อ soybean mosaic Potyvirus (SMV) แต่ไม่มีความสัมพันธ์ทางซีรุ่มวิทยากับเชื้อ tobacco mosaic Tobamovirus (TMV), cucumber mosaic Cucumovirus (CMV), peanut bud necrosis Tospovirus (PBNV) และไวรัสอื่น ๆ ในสกุล Potyvirus ได้แก่ cowpea aphid-borne mosaic Potyvirus (CAMV), chili vein-banding mottle Potyvirus (CVbMV), papaya ring spot Potyvirus (PRSV) และ peanut mottle Potyvirus (PMV) จากคุณสมบัติทางซีรุ่มวิทยาและทางซีรุ่มวิทยาจึงจัดจำแนกเชื้อ PSIV-SN และ PSIV-T6/97 เป็นสายพันธุ์ที่แตกต่างกันของเชื้อ PSIV

cDNA probes ที่ติดสลาด้วยสาร Digoxigenin จำเพาะกับบริเวณภายในโปรตีน replicase (probe # 14) และโปรตีนห่อหุ้ม (probe # 28) ของจีโนมเชื้อ PSIV-SN ถูกนำมาศึกษา cDNA probe ทั้งสองชนิดสามารถไฮบริไดซ์กับเชื้อ PSIV ที่นำมาทดสอบทุกสายพันธุ์ที่นำมาศึกษา มีความไวในการตรวจหา PSIV-SN บริสุทธิ์และการตรวจคัดกรองที่สกัดจากใบพืชเป็นโรคที่ระดับ 1 นาโนกรัม ไม่เกิดปฏิกิริยาไฮบริดเชรชันกับกรดนิวคลีอิกจากเชื้อ TMV, CMV, PBNV, CAMV, CVbMV, PRSV, PMV และ SMV บัพเฟอร์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับสกัดกรดนิวคลีอิกจากใบพืชเป็นโรค คือ บัพเฟอร์ TNA 1 (0.4 M Tris-HCl, pH 8.0, 1% (w/v) SDS, 5 mM EDTA pH 8.0, 4% (v/v) 2-mercaptoethanol) น้ำคั้นจากใบพืชเป็นโรคเตรียมได้โดยบดใบพืชในสารละลาย crude extract 2 (12X SSC+14.8% formaldehyde) โดยตรงในอัตราส่วนเท่ากัน สภาพไฮบริดเชรชันประกอบด้วย hybrid-buffer 2 ที่มี 50% formamide เป็นส่วนประกอบ และเขย่าเบา ๆ อย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง cDNA probe ทั้งสองชนิดไฮบริไดซ์กับ PSIV-RNA จากใบถั่วลิสงที่มีเชื้อ PSIV เข้าทำลายตามธรรมชาติ และในวัชพืชจากแปลงปลูกถั่วลิสง ทั้งในสภาพของ total nucleic acid หรือ น้ำคั้นใบพืชพบวัชพืช 3 ชนิด คือ หิงเม้น (*Crotalaria striata*), ตำลึง (*Coccinia indica*) และกระดุมใบ (*Richardia* sp.) ให้ผลบวกกับแอนติซีรุ่มและ cDNA probe ทั้งสองชนิดที่จำเพาะกับเชื้อ PSIV-SN จึงคาดว่าวัชพืชเหล่านี้เป็นพืชพื้ของเชื้อ PSIV โดยในการศึกษาครั้งนี้มีเพียงหิงเม้นที่สามารถยืนยันได้ว่าเป็นพืชอาศัยตามธรรมชาติของเชื้อ PSIV

เทคนิค dot blot hybridization สามารถนำมาใช้ตรวจหาเชื้อ PSIV ในเมล็ดถั่วลิสงได้ ปริมาณไวรัสในเมล็ดที่สามารถตรวจได้โดยทันทีด้วย cDNA probes เทียบเท่ากับ 10 นาโนกรัมไวรัสบริสุทธิ์ ซึ่งมีความไวมากกว่าการตรวจด้วยวิธี indirect-ELISA นอกจากนี้พบว่ามี 3 ใน 10 เมล็ดของเมล็ดถั่วลิสงที่ให้ผลลบกับการทำปฏิกิริยากับแอนติซีรุ่ม PSIV-SN โดยวิธี indirect-ELISA แต่ให้สัญญาณไฮบริดที่ชัดเจนมากกับ cDNA probes การเตรียมกรดนิวคลีอิกจากเมล็ดทำได้โดยการบดเนื้อเชื้อส่วนใบเลี้ยงใน seed extract 1 (0.4 M Tris-HCl pH 8.0, 2% (w/v) SDS, 5 mM EDTA pH 8.0, 4% (v/v) 2-mercaptoethanol) แล้วสกัดด้วย phenol : chloroform และตกตะกอนกรดนิวคลีอิกด้วยเอทานอล ปริมาณตัวอย่างเนื้อเยื่อใบเลี้ยงที่ให้ผลการตรวจสอบที่ชัดเจน คือ อย่างน้อย 0.5 กรัมต่อตัวอย่าง น้ำสารละลายกรดนิวคลีอิกผสมกับสารละลาย denature buffer (12 X SSC + 14.8% formaldehyde)

ในปริมาณเท่ากัน นำไปให้ความร้อนที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วทำให้เย็นลงโดยรวดเร็วบนน้ำแข็งก่อนการหยดลงบนแผ่นไมลอน

ABSTRACT

The study was conducted to determine biological and serological characteristics of two necrotic isolates of peanut stripe *Potyvirus*, PSTV-SN and PSTV-T6/97 and to develop a detection method base on nucleic acid hybridization techniques. The results showed that their host ranges were limited to the Chenopodiaceae, Pedaliceae, Solanaceae and Leguminosae families. However, type of disease symptom on some plant species or cultivars were different depending on the virus isolates. Severity of the symptom caused by both isolates on peanut cv. Tainan 9 was related to plants age. Inoculation at 1-2 weeks after seed emergence showed significantly more severe necrosis and reduction of plant growth compared to those being inoculated at 3-4 weeks old. The degree of disease severity caused by PSTV-SN was higher than that of PSTV-T6/97 at all ages of test plants. Both virus isolates induced cytoplasmic amorphous inclusion bodies in infected cells. The shape of inclusion bodies in PSTV-T6/97 infected leaf cells were varied depending on peanut cultivars whereas those of PSTV-SN were consistently global locating closed to the nucleus of plant cells.

Both virus isolates were successfully purified from infected peanut leaves. The procedure which yielded 8.92 milligram and 9.44 milligram virus preparation per 100 gram of infected leaves for PSTV-SN and PSTV-T6/97, respectively, started with grinding frozen infected leaves in 0.5 M potassium phosphate buffer pH 7.7. The sap was clarified with 10% (v/v) chloroform and virus was precipitated and concentrated by 8% polyethylene glycol (MW 6000), and subjected to 40% sucrose cushion centrifugation. Partially purified virus preparation was further purified by 10-40% sucrose density gradient centrifugation.

Purified PSTV-SN and PSTV-T6/97 preparations were injected into white rabbits to produce antisera. The specific antisera were obtained with titer of 1:16,000 and 1:10,000 respectively by indirect-ELISA. Purified PSTV-SN and PSTV-T6/97 were detected by indirect-ELISA at 40 ng and 30-40 ng virus, respectively. By using the prepared antisera it was found that the isolates were closely related to all of the tested-PSTV strains (T2, T3, T4, T5, T7 and T8) serologically; distantly related with soybean mosaic *Potyvirus* (SMV), but had no serological relationships with tobacco mosaic *Tobamovirus* (TMV), cucumber mosaic *Cucumovirus* (CMV), peanut bud necrosis *Tospovirus* (PBNV) and other viruses in genus *Potyviridae* including, cowpea aphid-borne mosaic *Potyvirus* (CAMV), chili vein-banding mottle *Potyvirus* (CVbMV), papaya ringspot *Potyvirus* (PRSV) and peanut mottle *Potyvirus* (PMV).

According to the biological and serological properties, the PSIV-SN and PSIV-T6/97 are classified as distinct strains of PSIV.

Digoxigenin-labeled cDNA probes corresponding to the internal replicase gene (# 14) and coat protein gene (# 28) of PSIV-SN genome were used. Both cDNA probes could hybridize with all of the tested-PSIV strains and could detect 1 ng of purified PSIV-SN and 1 ng of total nucleic acid extracted from PSIV-SN infected leaf tissue. No cross-hybridization between infected leaf extracts of TMV, CMV, PBNV, CAMV, CVbMV, PRSV, PMV and SMV were observed. The best buffer for total nucleic acid extraction was TNA buffer 1 (0.4 M Tris-HCl pH 8.0, 1% (w/v) SDS, 5 mM EDTA pH 8.0, 4% (v/v) 2-mercaptoethanol). Crude extract from infected leaf tissue was prepared by directly grinding the leaves with equal volume of crude extract 2 (12X SSC + 14.8% formaldehyde). Hybridization condition includes hybrid buffer 2 containing 50% formamide and consistently shaking overnight (16 h.) at 50 °C. Both of cDNA probes precisely hybridized with PSIV-RNA in both total nucleic acids or leaf extract of natural PSIV infected peanut leaves and weeds collected from peanut field. Three kinds of weed, *Crotalaria striata*, *Coccinia indica* and *Richardia* sp., positively reacted with antisera and specifically bind with cDNA probes of PSIV-SN indicating that they could be PSIV reservoir. Among the three species, *C. striata* has been definitely proved as a natural host for PSIV in this study.

Dot blot hybridization technique could be used to detect PSIV in peanut seeds. The virus concentration in peanut seed which could readily be detected by cDNA probes equals to 10 ng of purified virus. This sensitivity is greater than could be achieved by indirect-ELISA. In addition, three of ten seeds which negatively reacted to PSIV-SN antiserum by indirect-ELISA showed strong hybridized signal with cDNA probes. Total nucleic acid from peanut seed was prepared by grinding cotyledonary tissue in seed extract buffer 1 (0.4M Tris-HCl pH 8.0, 2% (w/v) SDS, 5 mM EDTA pH 8.0, 4% (v/v) 2-mercaptoethanol), followed by phenol : chloroform extraction and ethanol precipitation. At least 0.5 mg of cotyledonary tissue was required for getting cleared result. Total nucleic acids solution was mixed with an equal volume of denature buffer (12X SSC + 14.8% formaldehyde), heated at 65 °C for 15 min and rapidly chilled on ice before being dotted on nylon membrane.

ภาคผนวก

