

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์
(1 กันยายน 2539 - 31 สิงหาคม 2542)

การสร้าง Infectious transcript ของไวรัสจุดวงแหวนในมะละกอ
เพื่อใช้ศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของไวรัส

นางสาว สุณี เกิดบัณฑิต
สถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์
(1 กันยายน 2539 - 31 สิงหาคม 2542)

การสร้าง Infectious transcript ของไวรัสจุดวงแหวนในมะละกอ
เพื่อใช้ศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของไวรัส

นางสาว สุณี เกิดบัณฑิต
สถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ได้เล็งเห็นถึงความสำคัญของงานวิจัยและได้ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยโครงการนี้ ขอขอบคุณ คุณสุรภี กิริติยะอังกูร คุณกิตติศักดิ์ กิริติยะอังกูร จาก กองโรคพิษและจุลชีววิทยา และคุณวิไล ปราสาทศรี จากกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ซึ่งผู้ให้ตัวอย่างไวรัสใบด่างจุดวงแหวนในมะละกอเพื่อใช้ในการวิจัย ขอขอบคุณศาสตราจารย์ สกล พันธุ์ยิ้ม ผู้เป็นที่ปรึกษาของโครงการและให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย ขอขอบคุณสถาบันวิจัยอณูชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ผู้เป็นเจ้าของสถานที่และครุภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย ตลอดจนข้าราชการ เจ้าหน้าที่ นักวิจัย นักวิทยาศาสตร์และนักศึกษาที่ให้การสนับสนุนในงานวิจัยนี้ทั้งทางตรงและทางอ้อม

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะสร้าง full length infectious RNA transcript ของไวรัสใบด่างจวงหวานในมะละกอที่ระบาดในประเทศไทย (papaya ringspot virus, PRSV) เพื่อใช้ในการศึกษาไวรัสในระดับโมเลกุล

คณะผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีในการสกัด genomic RNA ของ PRSV type P และ type W และใช้เทคนิค RT-PCR ในการเพิ่มจำนวน cDNA ทางปลายด้าน 5' และ 3' ของ PRSV ทั้ง 2 ชนิด โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสที่อนุรักษ์ของ PRSV สายพันธุ์ Hawaii และ Taiwan จากฐานข้อมูลในการออกแบบ primers ที่จำเพาะเพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอทางด้านปลาย 5' และ 3' ของ PRSV ที่ระบาดในประเทศไทย ทำการศึกษาลำดับเบสของชิ้น cDNA ที่ได้ และออกแบบ primers ชุดที่สอง เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวน cDNA ทางด้านปลายสุดด้าน 5' และ 3' โดยใช้เทคนิค RACE-PCR ทำการ clone ชิ้น cDNA ที่ได้และศึกษาลำดับเบสด้านปลายสุดด้าน 5' และ 3' ของ PRSV ทั้ง 2 ชนิด เพื่อออกแบบ primers ในการเพิ่มจำนวน full length cDNA ของ PRSV โดยวิธี long and accurate PCR technique และวิธี megaprimer โดยใช้เอนไซม์ Expand Reverse Transcriptase และ Expand Long Template System (Roche) สามารถทำการเพิ่มจำนวน full length cDNA ของ PRSV ทั้ง 2 ชนิดได้ แต่พบว่าไม่สามารถ clone ชิ้น full length cDNA ของ PRSV เข้าในพลาสมิดพาหะได้ จึงได้ศึกษาจุดตัดด้วย restriction enzyme บน full length cDNA ของ PRSV และเลือกใช้เอนไซม์ที่เหมาะสมในการตัดแบ่ง full length cDNA ของ PRSV type W ออกเป็น 3 ชิ้นย่อย ทำการ clone แต่ละชิ้นย่อยเข้าไปในพลาสมิดพาหะ แล้วนำแต่ละชิ้นย่อยมาเชื่อมต่อเป็น full length cDNA แต่สำหรับ PRSV type P ต้องออกแบบ primers เพื่อทำการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอย่อยจาก viral RNA โดยวิธี RT-PCR ก่อน จึงทำการ clone ชิ้นดีเอ็นเอย่อยเข้าพลาสมิดพาหะ pUC19 แล้วทำการเชื่อมต่อดีเอ็นเอย่อยเพื่อให้ได้ full length cDNA ของ PRSV type P ทำการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมที่ได้โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ และตรวจสอบจุดที่เชื่อมต่อการศึกษาลำดับเบส

ขณะนี้การทดลองอยู่ในระหว่างการเชื่อมต่อดีเอ็นเอย่อยจากแต่ละพลาสมิดเพื่อให้ได้ full length cDNA เพื่อจะนำไป subcloned เข้าพลาสมิดที่สามารถสร้าง infectious transcripts ได้ และ subcloned เข้าพลาสมิดที่สามารถควบคุมการแสดงออกของยีนในพืชได้โดยใช้ 35S promoter เป็นตัวควบคุมต่อไป

Abstract

The aim of this project is to generate full length infectious RNA transcript of papaya ringspot virus (PRSV), which is the key step to further study this virus on molecular level.

An efficient technique to obtain high yield of genomic RNA from papaya ringspot virus (PRSV) particles type P and W was developed. The cDNA fragments near the 5' and 3' end of both PRSV strains were first amplified using RT PCR technique with primers derived from sequences of PRSV isolated from Hawaii and Taiwan. After sequencing, core primers based on this known sequence were designed and used to amplify the PRSV genome at the most 5' and 3' end regions by RACE-PCR technique. The amplified DNA fragments were cloned and sequenced. The knowledge of exact sequence of both ends of Thai PRSV allowed us design specific primers to amplify the full length cDNA of the PRSV; both type P and W, by long and accurate PCR technique using Expand Reverse Transcriptase and Expand Long Template PCR System (Roche). Both megaprimer technique and amplification with long PCR primers was developed. Although a relatively high amount of the full length was obtained in both type P and W isolates, it proved to be impossible to directly clone the amplified full length cDNA into a plasmid vector. Extensive restriction enzyme mapping of the amplified full length fragment was performed. The full length fragment was then either splitted into 3 parts by cutting at the unique restriction enzyme sites and/or amplified again from the original RNA by RT-PCR. Resulting fragments were cloned into modified pUC19 vector and the presence of the desired clone was confirmed by restriction enzyme analysis and sequencing. The separately cloned fragments were then combined to obtain the full length clone of PRSV. The ligation junctions were confirmed by sequencing.

The full length cDNA clones will be further subcloned into bacterial transcriptional cassettes to obtain infectious transcripts and into plant expressin cassette under control of 35S promoter. The unique vectors for generating the *in vitro* transcript of PRSV using T7 promoter and for infection by direct transcription of RNA under CaMV 35S promoter were also constructed. These experiments are now in progress.

สารบัญ

หัวข้อ	หน้า
บทนำ	1
วิธีการทดลอง	5
ผลการทดลอง	12
บทวิจารณ์	41
Output ที่ได้	43
หนังสืออ้างอิง	44

บทนำ

ไวรัสใบด่างจุดวงแหวนในมะละกอ

ไวรัสใบด่างจุดวงแหวนในมะละกอ หรือ papaya ringspot virus (PRSV) จัดอยู่ในกลุ่มของ potyvirus ซึ่งเป็นไวรัสกลุ่มใหญ่ที่สุดที่ก่อโรคในพืช ไวรัส PRSV เป็นไวรัสชนิดอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single stranded RNA) มีขนาดประมาณ 780x12 nm. มีลักษณะเป็นเกลียว บิดคด (flexuous) มีความยาวของจีโนมประมาณ 10 kb การแปลรหัสโปรตีนของไวรัสจะแปลเป็นโปรตีนเดี่ยวเส้นยาว (polyprotein) ซึ่งจะถูกย่อยออกเป็นโปรตีนย่อยอีกหลายชนิด ได้แก่ VPg, N terminal protein (NT), helper component protein (HC-Pro), 46K, cylindrical inclusion (CI), Nia-Nib nucleic inclusion proteins, coat protein เป็นต้น ปัจจุบันไวรัส PRSV สามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ PRSV type P และ type W ทั้ง 2 ชนิดนี้มีความคล้ายกันมาก ไม่สามารถแยกจากกันได้โดยรูปร่างหรือโดยวิธีทางชีววิทยา แต่สามารถแยกโดยดูจากการก่อโรคในพืชเจ้าบ้าน PRSV type P จะก่อโรคในมะละกอและพืชตระกูลแตงบางชนิด ขณะที่ PRSV type W ก่อโรคในพืชตระกูลแตงหลายชนิดแต่ไม่ก่อโรคในมะละกอ

โรคใบด่างจุดวงแหวนในมะละกอที่เกิดจากไวรัส PRSV type P ปัจจุบันพบระบาดรุนแรงในทุกภาคของประเทศไทยที่มีการปลูกมะละกอ ไวรัสนี้สามารถแพร่ระบาดได้โดยมีเพลี้ยอ่อนเป็นพาหะ เพียงระยะเวลาสั้นๆ (วินาที) ที่เพลี้ยอ่อนเข้ากัดใบมะละกอ จะสามารถปล่อยไวรัสเข้าสู่มะละกอและแพร่กระจายไปทั่วทั้งต้น ไวรัส PRSV type P สามารถเข้าทำลายมะละกอได้ทุกระยะ ตั้งแต่ระยะที่เป็นต้นอ่อนจนถึงระยะที่มะละกอเติบโตเต็มที่ อาการเริ่มแรกของโรคจะเห็นชัดที่ใบมีลักษณะของใบด่าง หักงอผิดรูปร่าง และจะมีขีดซ้ำๆตามลำต้น ถ้ามะละกอเป็นโรคในระยะที่เป็นต้นอ่อนจะมีอาการรุนแรงมาก ต้นจะแคระแกรน ไม่ติดผล ถ้ามะละกอเป็นโรคในระยะต้นโต มะละกอสามารถให้ผลได้ แต่จะทำให้ปริมาณผลผลิตและคุณภาพของมะละกอลดลงเป็นอย่างมาก

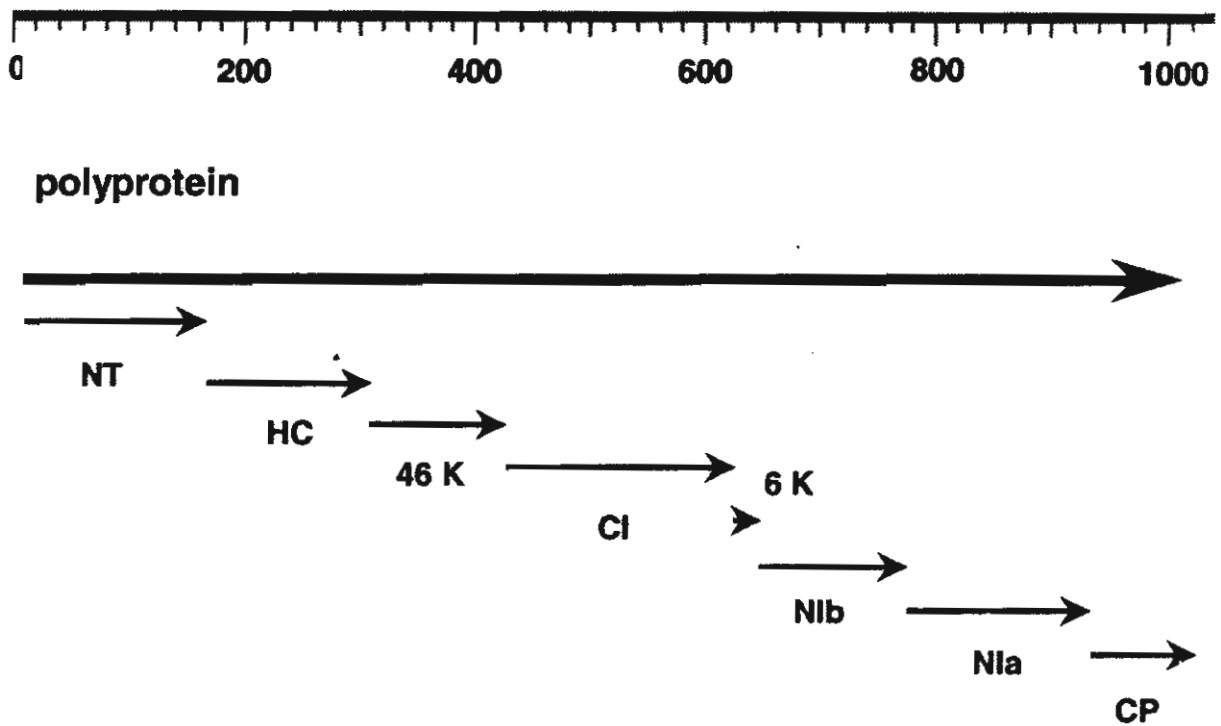
จากปัญหาการระบาดอย่างรุนแรงของไวรัสใบด่างจุดวงแหวนซึ่งทำให้ผลผลิตของมะละกอลดต่ำลงอย่างมากในระยะหลายปีที่ผ่านมา ในขณะที่ความต้องการผลผลิตมะละกอส่งขึ้น ทำให้มีความจำเป็นเร่งด่วนในการหาวิธีการที่ได้ผลในการป้องกันการระบาดของไวรัสชนิดนี้

วิธีการที่นำมาใช้ในประเทศไทยเพื่อควบคุมโรคใบด่างจุดวงแหวนในปัจจุบัน ได้แก่

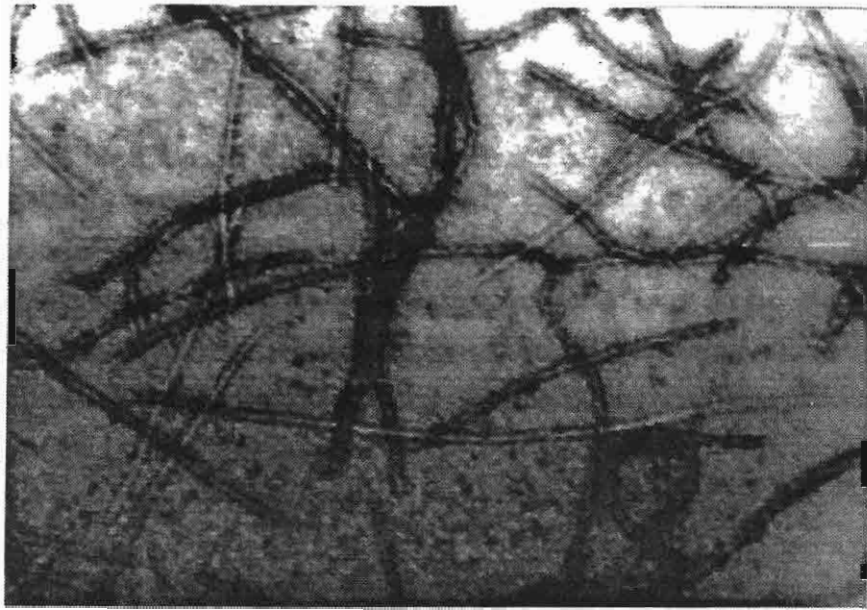
1. การตัดต้นมะละกอที่เป็นโรคทิ้ง
2. การป้องกันโรคโดยใช้เชื้ออ่อนของไวรัส (mild strain) ปลูกเป็นวัคซีนในมะละกอต้นอ่อน เพื่อสร้างภูมิคุ้มกัน (cross protection) ผู้วิจัยรายงานว่าวิธีการนี้สามารถช่วยชะลอการเกิดโรคให้ช้าลงได้ในระดับหนึ่ง แต่ยังไม่สามารถทำให้มะละกอมีความต้านทานโรคได้อย่างถาวร (วิชัย ไชสิตรัตน, 2541)
3. การพัฒนามะละกอด้านทานโรคโดยการผสมพันธุ์มะละกอเข้ากับพันธุ์ทนทานโรคจากสหรัฐอเมริกา (Florida tolerant variety) ได้พันธุ์ผสมแยกค่าทำพระ ซึ่งพบว่ามีความต้านทานต่อโรคได้ในระดับหนึ่ง แต่ก็ยังไม่สามารถป้องกันโรคได้อย่างได้ผล

4. การใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการสร้างมะละกอแปลงพันธุ์ โดยใช้ยีนเปลือกไวรัส (viral coat protein gene) ติดต่อกับพลาสมิดพาหะ และนำยีนนี้เข้าสู่เซลล์มะละกอ มีรายงานว่าวิธีนี้สามารถใช้ป้องกันโรคได้ แต่เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง มะละกอแปลงพันธุ์ที่ได้จะต้านทานเฉพาะสายพันธุ์ของไวรัส PRSV ชนิดที่ได้นำยีนเปลือกไวรัสนั้นใส่ไปในมะละกอ แต่จะไม่ต้านทานไวรัส PRSV สายพันธุ์อื่น ๆ

Genomic RNA



รูปที่ 1. จีโนมของไวรัส PRSV มีขนาดประมาณ 10326 เบส มีการแปลรหัสโปรตีนเป็นโปรตีนเส้นเดี่ยว ซึ่งจะถูกย่อยเป็นโปรตีนได้แก่ N-terminal protein (NT)-52K helper component protein (HC)-46K protein-72K cylindrical protein (CI)-6K protein-48K nucleic inclusion protein (Nla)-59K nucleic inclusion protein (Nib)-35K coat protein (CP)



รูปที่ 2. รูปร่างของไวรัส PRSV เมื่อดูด้วยกล้อง transmission electron microscope (40,000x),

Infectious RNA transcripts *in vitro*

ไวรัสก่อโรคในพืชส่วนใหญ่เป็นไวรัสชนิด RNA (Mathews, 1982) ไวรัสเหล่านี้มีความแตกต่างกันทั้งด้านรูปร่าง ลักษณะจีโนม การแบ่งตัว กลไกการก่อโรค การศึกษาไวรัสในระดับโมเลกุลทำให้สามารถเข้าใจความสัมพันธ์ระหว่างไวรัสกับพืชเจ้าบ้าน ซึ่งนำไปใช้ในการป้องกันไวรัสได้อย่างได้ผล ความก้าวหน้าทางอนุชีววิทยาทำให้สามารถสร้าง full length cDNA clones จากไวรัสพืชชนิดที่เป็น RNA virus ในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) ซึ่งเป็นความก้าวหน้าที่สำคัญในการศึกษาของไวรัสในระดับโมเลกุล วิธีนี้สามารถสร้าง mutation ในจุดต่างๆของยีน เพื่อดูความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นจาก mutation ที่ยีนของไวรัสและการก่อโรค เช่น การเพิ่มจำนวนของไวรัสในพืช การเคลื่อนที่ของไวรัสจาก cell หนึ่งไปยัง cell อื่นๆ และแพร่กระจายของไวรัสจากส่วนที่เริ่มเป็นโรคไปยังส่วนอื่นๆของพืช

ปัจจุบันมีรายงานถึงวิธีการสร้าง infectious RNA transcripts จาก full length cDNA clones จากไวรัสพืชชนิด RNA virus หลายชนิด เช่น bromovirus (BMV) (Ahlgquist and Janda, 1984), alfalfa mosaic virus RNA4 (Langereis et al, 1986), cowpea mosaic virus (CMV) (Vos et al, 1988) ส่วนใหญ่ได้ทำการ clone ส่วนของ full length cDNA เข้าไปในพลาสมิดพาหะโดยมี promoter เช่น T7 promoter เป็นตัวควบคุม และใช้เอนไซม์ T4 polymerase ในการสร้าง infectious RNA transcripts จาก recombinant clones ที่ได้ แล้วนำ infectious RNA transcripts ไปทดสอบในพืช พบว่ามีปัจจัยสำคัญหลายอย่างที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการก่อโรคของ infectious RNA transcripts เช่น พบว่าการมีลำดับเบสเพิ่มระหว่าง promoter กับปลายด้าน 5' ของ full length cDNA construct อาจทำให้การก่อโรคลดลง (Dzianott and Bujarski, 1988, Dzianott and Bujarski, 1989, Janda et al, 1987) ไวรัสบางชนิดต้องการ 5' cap structure (Contreras et al, 1982) ขณะที่ไวรัสบางชนิดอาจต้องการโปรตีนที่เชื่อมกับด้าน 5' ของ infectious transcripts (5'-linked protein or VPg)

(Tobin *et al*, 1989) ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของไวรัส ดังนั้นในการสร้าง infectious RNA transcripts *in vitro* จึงต้องคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่อาจเกี่ยวข้องกับเหล่านี้ด้วย

ได้มีรายงานว่าสามารถใช้เทคนิคด้าน PCR ในการสร้าง full length cDNA จาก RNA virus แทนที่จะใช้วิธีการ cloning cDNA ตามวิธีเดิม แต่เทคนิค PCR มีข้อจำกัดในการสร้าง long cDNA fragment เนื่องจากเอนไซม์ *Taq* polymerase มีความแม่นยำไม่สูงพอในการสร้างดีเอ็นเอที่ยาว (Keohavong and Tilly, 1989) ต่อมาพบว่าการนำเอนไซม์ *KlenTaq* และ *Pfu* polymerase ซึ่งมีความแม่นยำสูงกว่าเอนไซม์ *Taq* polymerase มาใช้ร่วมกันในปฏิกิริยา long accurate PCR (LA PCR) สามารถสร้างเส้นดีเอ็นเอได้ยาวถึง 40 kb (Barnes, 1994) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะนำวิธีการสร้างดีเอ็นเอสายยาวโดยเทคนิค LA PCR มาใช้ในการสร้าง full length cDNA ของไวรัส papaya ringspot virus (PRSV)

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

สร้าง Infectious RNA transcript ของ papaya ringspot virus (PRSV) เพื่อใช้ในการศึกษาชิ้นของไวรัสในระดับโมเลกุล โดยเฉพาะชิ้นที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนไวรัสในพืชเจ้าบ้านและชิ้นที่เกี่ยวข้องกับการก่ออาการโรคในพืช

วิธีการทดลอง

1. การแยกบริสุทธิ์สารพันธุกรรม RNA ของไวรัส PRSV สายพันธุ์อ่อน (MP 833) และสายพันธุ์รุนแรง (ราชบุรี) จากใบมะละกอที่เป็นโรค

ทำการทดลองแยกบริสุทธิ์สารพันธุกรรม RNA ของไวรัส PRSV สายพันธุ์อ่อน (MP 833) และสายพันธุ์รุนแรง (ราชบุรี) จากใบมะละกอที่เป็นโรคโดยใช้วิธี Triazol RNA isolation techniques (Gibco)

2. การศึกษาลำดับเบส ทางด้านปลาย 5' และปลาย 3' ของสารพันธุกรรมของไวรัส เพื่อใช้ในการออกแบบ primers ที่จำเพาะ

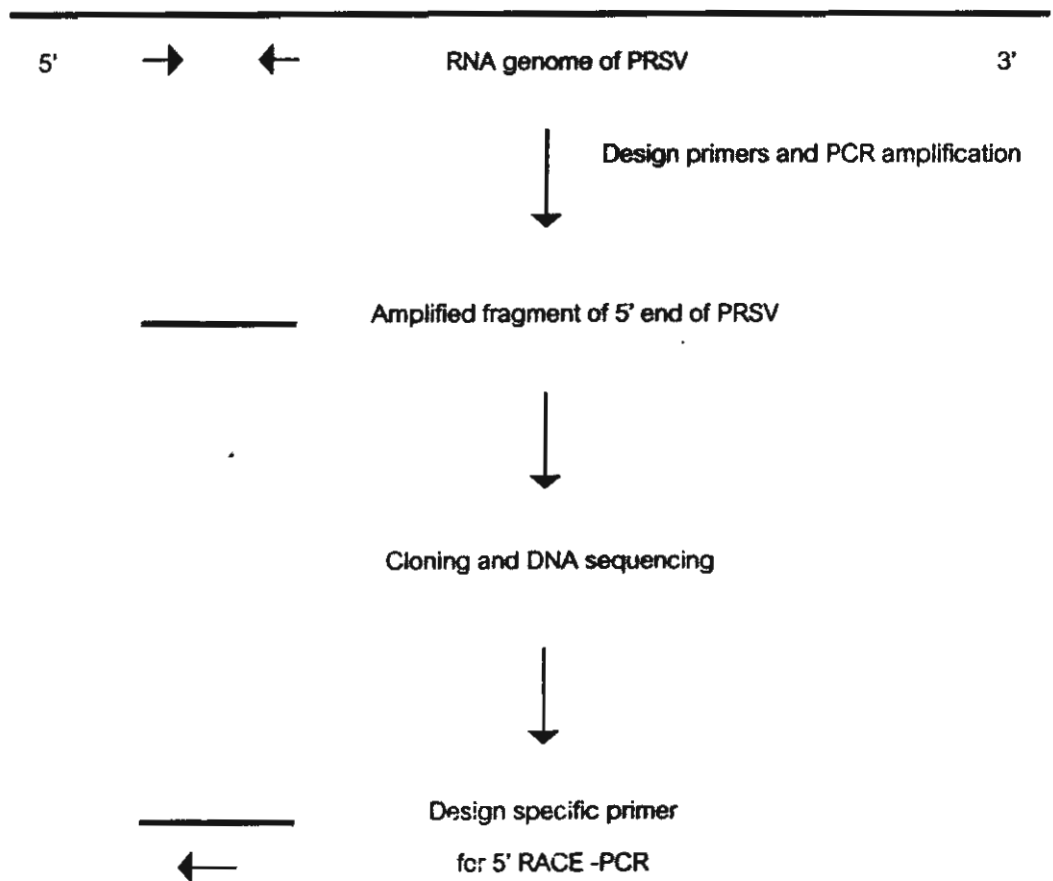
การทดลองได้แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

2.1 การศึกษาลำดับเบสทางด้านปลาย 5' ของสารพันธุกรรมของไวรัส PRSV สายพันธุ์รุนแรงที่ระบาดที่ราชบุรี

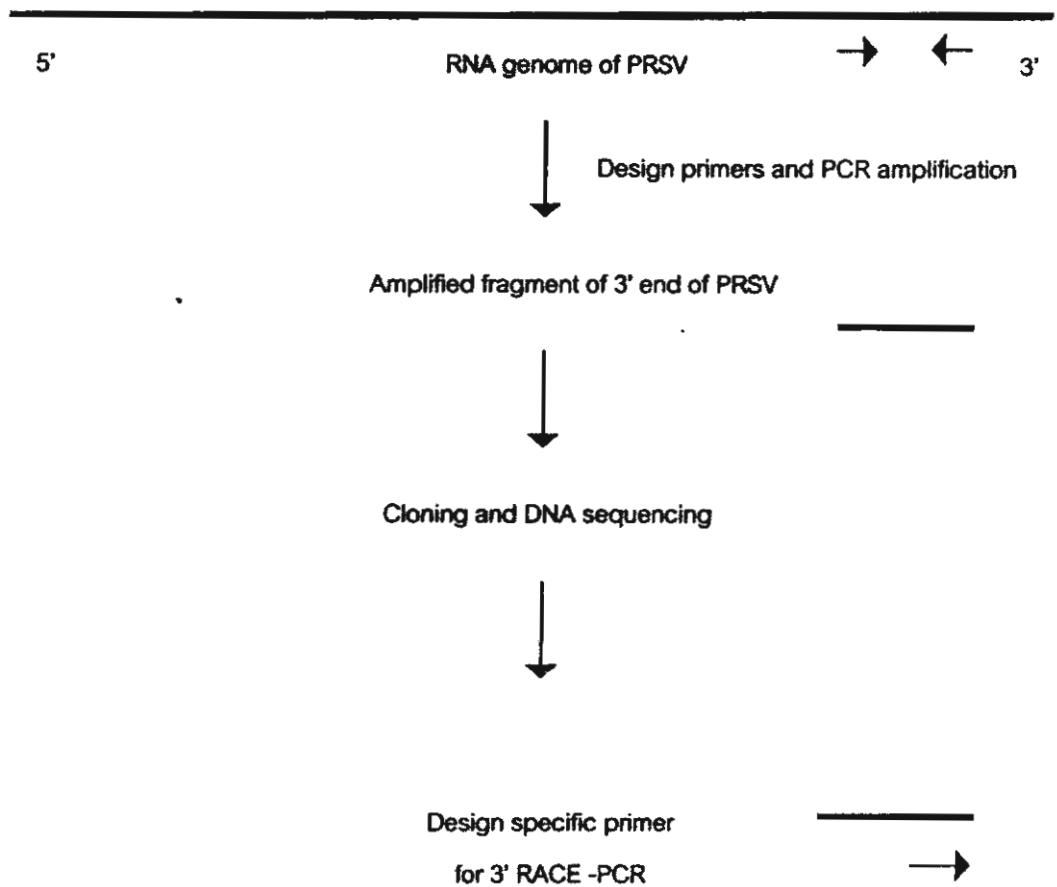
เนื่องจากยังไม่มีผู้ทำการศึกษาข้อมูลของลำดับเบสทางด้านปลาย 5' ของไวรัส PRSV ที่พบในประเทศไทย ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาลำดับเบสดังกล่าวเพื่อใช้ในการออกแบบ primers เพื่อใช้สร้าง infectious transcripts ในขั้นตอนต่อไป จึงได้ทำการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรมทางด้านปลาย 5' ของไวรัส โดยได้ทำการออกแบบ primers ทางด้านปลาย 5' ของสารพันธุกรรมของไวรัส PRSV โดยการเปรียบเทียบ consensus sequences จากข้อมูลของลำดับเบสของไวรัส PRSV สายพันธุ์ Hawaii และลำดับเบสของ plum pox virus ที่มีรายงานอยู่ใน GenBank แล้วใช้ primers ที่ออกแบบดังกล่าวนี้ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมทางด้านปลาย 5' ของไวรัสสายพันธุ์รุนแรงที่พบในประเทศไทย จากนั้นจึงได้ทำการตัดต่อชิ้นส่วนของยีนที่ได้เข้าไปใน plasmid pUC18 เพื่อทำการศึกษาลำดับเบสของชิ้นส่วนดังกล่าว เพื่อใช้ออกแบบ primers ชุดที่สองสำหรับการทำ 5' RACE-PCR (รูปที่ 3)

2.2 ศึกษาลำดับเบสของสารพันธุกรรมของปลายด้าน 3' ของสารพันธุกรรมของไวรัส PRSV สายพันธุ์รุนแรงที่ระบาดที่ราชบุรี

ได้ทำการออกแบบ primers สำหรับเพิ่มจำนวนยีน viral coat protein ของ PRSV ซึ่งอยู่ทางด้านปลาย 3' ของ viral genome ทำการเพิ่มจำนวนของยีนดังกล่าวด้วยวิธี PCR และ clone ยีนดังกล่าวเข้าไปในพลาสมิดพาหะ pUC18 เพื่อศึกษาลำดับเบสของยีนดังกล่าวจาก PRSV สายพันธุ์รุนแรงที่ระบาดที่ราชบุรี เพื่อใช้ในการออกแบบ primers ทางด้านปลาย 3' ของไวรัสในการสร้าง Infectious transcript ในขั้นตอนต่อไป (รูปที่ 4)



รูปที่ 3. แผนผังแสดงวิธีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและศึกษาลำดับเบสของสารพันธุกรรมของปลายด้าน 5' ของ PRSV



รูปที่ 4. แผนผังแสดงวิธีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและศึกษาลำดับเบสของสารพันธุกรรมของปลายด้าน 3' ของ PRSV

3. การทดลองสร้าง full length cDNA ของ PRSV ด้วยวิธี Long Accurate PCR

ได้ทำการออกแบบ primers ทางด้านปลายสุด 5' และ 3' จากลำดับเบสที่ได้จากการทดลองที่ผ่านมา และใช้ primers นี้ในการเพิ่มจำนวน full length cDNA ของ PRSV ซึ่งมีขนาดประมาณ 10 kb โดยใช้เอนไซม์ Expand Reverse Transcriptase และ Expand Long Template PCR System จากบริษัท Boehringer Mannheim

4. การทดลองสร้าง full length cDNA โดยใช้วิธี Mega Primers

ได้ทดลองใช้วิธี megaprimers (Sarkar and Sommer, 1990; Aiyar and Leis, 1993; Barik, 1997) ในการเพิ่มจำนวน full length cDNA ของ PRSV เดิมวิธีนี้เป็นวิธีใช้ในการทำ site directed mutagenesis แต่ได้มีการพบว่าสามารถนำวิธีนี้มาใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของ potato virus ที่มีขนาดใหญ่ถึง 10 kb ได้ (Fakhfakh *et al.*, 1996) เราจึงได้ทดลองนำวิธีนี้มาใช้โดยได้ออกแบบการทดลองดังนี้ (รูปที่ 5)

4.1 ออกแบบ primers ทางด้านปลาย 5' คือ GEN-F forward primer and GSP1 reverse primer เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอขนาด 521 bp ทางปลาย 5' และใช้ชิ้นดีเอ็นเอนี้เป็น megaprimer สำหรับปลายทางด้าน 5' (M5)

4.2 ใช้ primers ทางปลาย 3' คือ PRSV-F forward primer และ GEN-R reverse primer เพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1 kb ทางปลาย 3' แล้วตัดดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอนไซม์ Spe I เพื่อให้เหลือชิ้นดีเอ็นเอขนาด 852 bp ซึ่งมีความจำเพาะกับ PRSV เพื่อใช้เป็น megaprimer ทางปลายด้าน 3' (M3)

4.3 ใช้เอนไซม์ Mung Bean nuclease กำจัดเบส A ซึ่งเติมเข้ามาทางด้านปลาย 3' ของ megaprimers แบบ non specific (Chattopadhyay and Raha, 1997)

4.4 ใช้ megaprimers M5 และ M3 ในการทำปฏิกิริยา long range PCR

5. การตรวจสอบ PRSV type P สายพันธุ์อ่อน

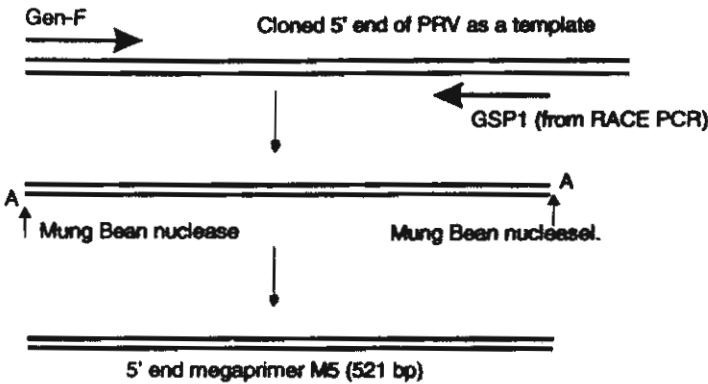
เนื่องจากที่ผ่านมาสถาบันฯไม่มีเรือนเพาะชำที่เหมาะสมในการปลูกเชื้อไวรัส PRSV เอง ขอความอนุเคราะห์ตัวอย่างไวรัสจากกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ดังนั้นจึงได้ทำการจัดสร้างเรือนเพาะชำขนาดเล็กที่มีตาข่ายชนิดถี่ (60 metz) ขึ้นที่สถาบันฯเพื่อใช้ในการทดลอง และได้ทำการตรวจสอบการก่อโรคในมะละกอโดย PRSV type P สายพันธุ์อ่อนและสายพันธุ์รุนแรงที่ได้รับจากกรมวิชาการเกษตรในเรือนเพาะชำของสถาบันฯเพื่อตรวจซ้ำ (confirm) โดยนำไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้ไปปลูกเชื้อในต้นมะละกอในเรือนเพาะชำ

6. การตรวจสอบไวรัส PRSV type W

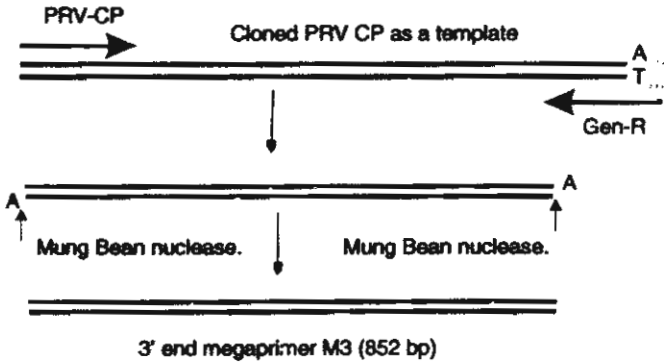
จากรายงาน PRSV type W มีความใกล้เคียงกับ PRSV type P มาก แต่สามารถก่อให้เกิดโรคเฉพาะในพืชตระกูลแตง แต่ไม่ก่อโรคในมะละกอ ขณะที่ PRSV type P ก่อโรคได้ในมะละกอและแตงบางชนิดเท่านั้น จึงได้ทำการทดสอบปลูกเชื้อ PRSV ทั้ง 2 ชนิดกับต้นมะละกอ แตงไทย แตงป่า และฟักทอง

Fig 5. Revised Strategy for PRSV Genome Cloning

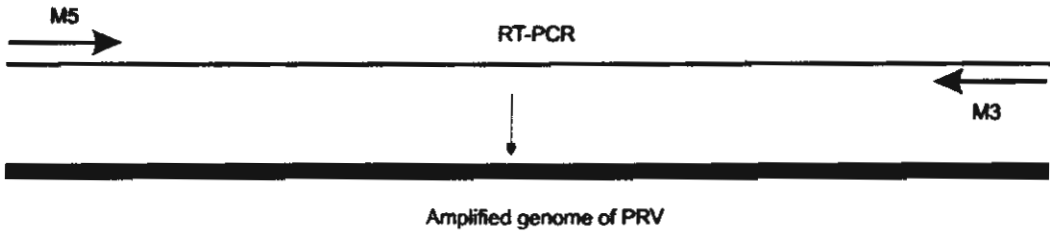
5' end “megaprimer” (M5)



3' end “megaprimer” (M3)



Final amplification



7. การศึกษาลำดับเบสของสารพันธุกรรมทางปลายสุดของด้าน 5' และ ปลาย 3' ของ papaya ringspot virus type W ด้วยวิธี RACE-PCR

ในการสร้าง Infectious transcript ของ PRSV type W จะต้องทราบลำดับเบสที่ถูกต้องทางด้านปลาย 2 ข้างของจีโนมของไวรัส ที่ผ่านมายังไม่เคยมีการรายงานข้อมูลลำดับเบสที่สมบูรณ์ของ PRSV type W ใน GenBank มาก่อน ดังนั้นจึงทดลองใช้เทคนิค RACE PCR ในการเพิ่มจำนวนยีนทางปลายสุดด้าน 5' และ 3' โดยใช้ primers ที่เคยออกแบบสำหรับ RACE PCR ของ PRSV type P ในการทดลอง

8. การเพิ่มจำนวน full length cDNA ของ PRSV type P และ type W

จากการทดลองที่ผ่านมาได้ทดลองใช้วิธี megaprimers ในการเพิ่มจำนวน full length cDNA ของ PRSV type P ได้พบว่าวิธีนี้สามารถเพิ่มจำนวนแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 10 kb ซึ่งเป็น full length genome ของ PRSV ได้ แต่แถบดีเอ็นเอขนาด 10 kb ที่ได้มีปริมาณน้อยมาก ไม่เพียงพอที่จะใช้ในการทดลองขั้นต่อไป จึงได้ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาเพื่อให้ได้ full length cDNA ของ PRSV type P มากขึ้น และได้ทำการออกแบบ primers ชุดอื่นๆเพิ่มเติมเพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนของ full length cDNA ของทั้ง PRSV type P และ type W และใช้เอนไซม์ Expand Taq RT PCR (Boehringer) แทนการใช้วิธี megaprimers

9. การเติมปลาย poly A tailing และการโคลน full length genome เข้าสู่พลาสมิดพาหะ

เนื่องจากมีรายงานว่า poly A tail ทางด้านปลาย 3' มีความสำคัญในการก่อโรคของไวรัส จึงได้ทดลองใส่ poly A tail ขนาด ประมาณ 100 เบสเข้าไปใน full length genome ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดย PCR และทำการเชื่อมต่อดีนีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิดพาหะ pUC19 โดยวิธี A-T annealing

10. การศึกษา restriction enzyme mapping ของ full length cDNA ของ PRSV type P

ทดลองใช้ restriction enzymes *Bam*HI, *Kpn*I, *Nar*I, *Not*I, *Pac*I, *Pvu*II, *Sac*I, *Sma*I, *Stu*I, *Xba*I และ *Xho*I ในการตัด full length cDNA ของ PRSV type P

11. การ clone ชิ้นย่อยของ full length cDNA ของ PRSV type P

ได้ออกแบบ primers เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอย่อยของ full length cDNA ของ PRSV type P จำนวน 3 ชิ้นย่อยคือ ส่วนของปลายด้าน 5' ปลายด้าน 3' และส่วนกลาง และใช้ enzymes Expand RT PCR ในการเพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอทั้ง 3 ชิ้น และตัดต่อดีนีเอ็นเอเข้าไปในพลาสมิด pUC18 โดยวิธี blunt end cloning นำพลาสมิดลูกผสมที่ได้ไปศึกษาลำดับเบสเพื่อให้ได้ clone ที่มีลำดับเบสที่ถูกต้องและมีตำแหน่งของจุดตัด enzyme ตามที่ได้ศึกษาไว้

12. การศึกษา restriction enzyme mapping ของ full length cDNA ของ PRSV type W

ทดลองใช้ restriction enzymes *Eco*RV, *Kpn*I, *Nco*, *Pst*I ในการตัด full length cDNA ของ PRSV type W เพื่อหาจุดตัดที่เหมาะสมในการใช้ cloning ชิ้นดีเอ็นเอย่อยของ full length cDNA ของ PRSV type W

13. การ clone ชิ้นดีเอ็นเอของ full length cDNA ของ PRSV type W

ได้ใช้ restriction enzymes *EcoRV* ในการตัด full length cDNA ของ PRSV type W เป็น 3 ชิ้นย่อย แล้วทำการ clone แต่ละชิ้นย่อยเข้าไปในพลาสมิดพาหะ เพื่อทำการเชื่อมต่อเป็น full length cDNA

14. ศึกษาวิธีการเตรียม protoplast จากใบมะละกอ

โดยการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียม protoplast ดังนี้คือ

4.1 ทำการหาความเข้มข้นของสารละลาย mannitol ที่เหมาะสมโดยใช้ความเข้มข้นที่ต่างกัน

4.2 ทำการหาชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการใช้เตรียม protoplast

15. ศึกษาวิธีการนำ RNA ของ PRSV เข้าสู่ protoplast ที่เตรียมจากใบมะละกอโดยใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation)

ได้ทดลองนำ RNA ของ PRSV เข้าสู่ protoplast ที่เตรียมจากใบมะละกอโดยใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation) เพื่อใช้เป็นแบบจำลองศึกษาการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของไวรัสในพืชเจ้าบ้านดังนี้

15.1 สกัด RNA จากอนุภาคไวรัส PRSV ที่เลี้ยงไว้ในมะละกอเจ้าบ้านโดยวิธี Quiagen RNeasy kits (Quiagen)

15.2 เตรียม protoplast จากใบมะละกอโดยใช้เอนไซม์ cellulase 2% และ macerozyme 0.2%

15.3 ทดสอบการนำ RNA เข้าสู่ protoplast โดยใช้สภาวะต่าง ๆ กันดังนี้

-ทดลองใช้ capacitance 75 μF คงที่ และใช้สนามไฟฟ้า (field strength) ขนาดต่าง ๆ กัน 150, 250, 350, และ 500 V/cm

-ทดลองใช้ field strength 250 V/cm คงที่ และใช้ capacitance ต่าง ๆ กันที่ 50, 75, 100, 125, 150 μF

15.4 ตรวจสอบการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ RNA ของ PRSV ใน protoplast หลังจากการทำ electroporation เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการสกัด RNA จาก protoplast ดังกล่าวด้วยวิธี hot phenol และตรวจสอบด้วยวิธี dot blot และ Northern Blot hybridization โดยใช้ coat protein gene ที่ติดฉลากด้วย Digoxigenin labeling kit ของบริษัท Boehringer Mannheim

ผลการทดลอง

1. การแยกบริสุทธิ์สารพันธุกรรม RNA ของไวรัส PRSV สายพันธุ์อ่อน (MP 833) และสายพันธุ์รุนแรง (ราชบุรี)

จากการแยกบริสุทธิ์สารพันธุกรรม RNA ของไวรัส PRSV สายพันธุ์อ่อน (MP 833) และสายพันธุ์รุนแรง (ราชบุรี) จากใบมะละกอที่เป็นโรค โดยใช้วิธี Triazol RNA isolation techniques (Gibco) ทำให้ได้สารพันธุกรรม RNA ที่บริสุทธิ์สำหรับการดำเนินการทดลอง

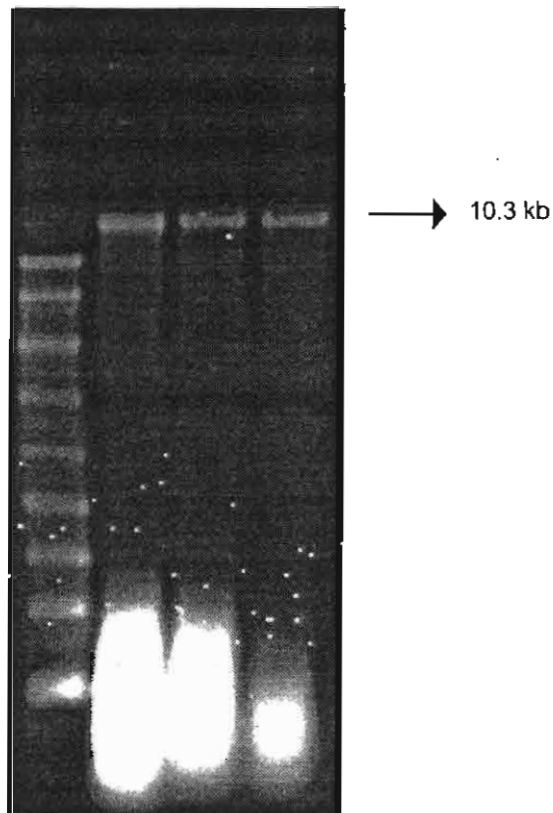


Fig 6. Isolation of PRSV genomic RNA from papaya leaves infected with severe PR SV.

2. การศึกษาลำดับเบสทางด้านปลาย 5' และปลาย 3' ของสารพันธุกรรมของไวรัส

2.1 การศึกษาลำดับเบสทางด้านปลาย 5' ของสารพันธุกรรมของไวรัส PRSV สายพันธุ์รุนแรงที่ระบาดที่ราชบุรี

2.1.1 จากการใช้ primers ที่ได้ออกแบบโดยใช้ consensus sequences จากข้อมูลของลำดับเบสของไวรัส PRSV สายพันธุ์ Hawaii, Taiwan และลำดับเบสของ plum pox virus ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมทางด้านปลาย 5' ของไวรัส PRSV สายพันธุ์รุนแรงที่พบที่จังหวัดราชบุรี สามารถทำการเพิ่มจำนวนได้ขึ้นดีเอ็นเอขนาด 398 เบส

2.1.2. ได้ทำการตัดต่อขึ้นดีเอ็นเอที่ได้เข้าไปใน plasmid pUC18 และทำการศึกษาลำดับเบสของขึ้นดีเอ็นเอดังกล่าว พบว่ามี sequence homology กับ PRSV สายพันธุ์ Hawaii ที่รายงานใน GenBank เพียง 74%

2.1.3. จากลำดับเบสที่ได้ในข้อ 2 ได้ทำการออกแบบ primers ชุดที่สอง เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมทางปลายสุดของด้าน 5' ของ PRSV สายพันธุ์รุนแรงที่ระบาดที่ราชบุรีโดยใช้เทคนิค 5' RACE-PCR

2.1.4. ทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมทางปลายสุดของด้าน 5' ของ PRSV สายพันธุ์รุนแรงที่ระบาดที่ราชบุรีด้วยวิธี 5' RACE-PCR พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมได้ขึ้นดีเอ็นเอขนาด 535 เบส ซึ่งได้ทำการตัดต่อขึ้นดังกล่าวเข้าไปในพลาสมิดพาหะ pUC18 และศึกษาลำดับเบสของขึ้นดีเอ็นเอดังกล่าวเปรียบเทียบกับลำดับเบสของสายพันธุ์ Hawaii ที่ได้มีรายงาน พบว่ามีลำดับเบสที่เหมือนกัน 70 % (nucleotide sequence homology) และมีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกัน 75 % (amino acid sequence homology) (Fig. 7)

Fig 7. Amino acid sequence homology of the 5' regions of PRSV isolated from Rajchaburi compared with PRSV Hawaiian strain.

```

5' end MSSLYQLQPIALKDRLLAHKKKGWIEHKLKRGDRGNTPHVGEFVVSEG
Hawaii  -----T-RAA-QY--R-ES---S--v-----e---HYCS--Di-K-

5' end AKILQLIQIGNAEVGRFLEGDRKTXADIFEIVKK'IMVGHLLGYDFECLEW
Hawaii  -----v-----T---T---n-FVR-n-----ir-----r-----S---

5' end CCHSCDKTSKYPFKKCDGKYYYSERNLIKSMHDLMYQFNMTASEIDQV
Hawaii  V-rN-----E-----T-----mrt-N-----d--P---nS-

5' end EYNYLAEAVNFAEQSVIKSKVPVSVEPDFVKPIVASEESLLVVPEPEIVP
Hawaii  dLE---N--dy---L-Kr-Q--EP--LAMmE-----G-Gi-m-S---vm-

5' end VTTKVEEAWTIQIGEIPVPLIVIKE
Hawaii  -----v-----

```

2.2 การศึกษาลำดับเบสของสารพันธุกรรมของปลายด้าน 3' ของสารพันธุกรรมของไวรัส PRSV สายพันธุ์รุนแรงที่ระบาดที่ราชบุรี

2.2.1. จากการใช้ primers ที่ทำการออกแบบดังกล่าว สามารถทำการเพิ่มจำนวนของยีนทางด้านปลาย 3' ของไวรัสด้วยวิธี PCR ทำให้ได้ชิ้น DNA ขนาด 962 เบส จากการศึกษาลำดับเบสของยีนดังกล่าวพบว่ามี sequence homology กับลำดับเบสของไวรัส PRSV สายพันธุ์ Hawaii 92%

2.2.2. ได้ทำการออกแบบ primers ชุดที่สอง เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมไวรัสทางปลายสุดของด้าน 3' ด้วยวิธี 3' RACE-PCR

2.2.3. ทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมไวรัสทางปลายสุดของด้าน 3' โดยวิธี 3' RACE-PCR พบว่าสามารถขยายเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอขนาด 462 เบส

จากที่ได้ทำการออกแบบ primers เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมทางปลายสุดของด้าน 3' ของ PRSV สายพันธุ์รุนแรงที่ระบาดที่ราชบุรีโดยใช้เทคนิค 3' RACE-PCR สามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมได้ ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 462 เบสนั้น ได้ทำการตัดต่อยีนดังกล่าวเข้าไปในพลาสมิดพาหะ pUC18 และได้ทำการศึกษาลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าว เปรียบเทียบกับลำดับเบสของสายพันธุ์ Hawaii ที่ได้มีรายงาน พบว่ามีลำดับเบสที่เหมือนกัน 98 % (nucleotide sequence homology)

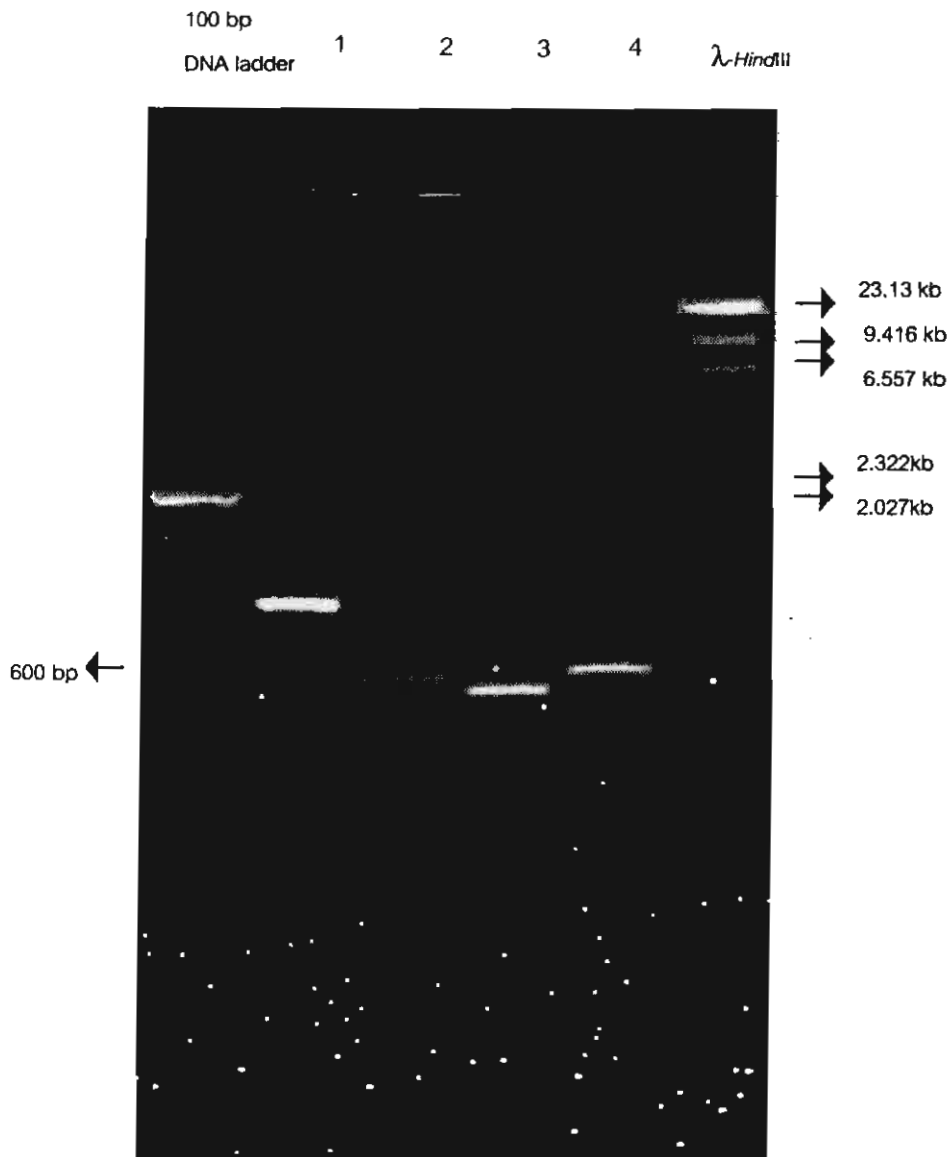


Fig 8. RT-PCR and RACE-PCR amplification of PR SV. Lane 1 is the 962 bp fragment of the coat protein at the 3' end Lane 2 is the 462 bp fragment of the most 3' end Lane 3 is the 398 bp fragment near the 5' end and Lane 4 is the 535 bp fragment of the most 5' end of the PR SV.

Fig 9. Amino acid sequence homology of the coat protein at the 3'regions of various strains of PRSV

payp	SKMEAVDAGLMEKLLKKEKQKKEKKEKQKKEKDDASDGMVSTSTKTGERDRDVHVGTSQTFTVPRIKSFPTDKMILPRIKGTIVLMLNH
aust	SKMEAVDAGLMEKLLKKEKQKKEKKEKQKKEKDDASDGMVSTSTKTGERDRDVHVGTSQTFTVPRIKSFPTDKMILPRIKGTIVLMLNH
chum	SKMEAVDAGLMEKLLKKEKQKKEKKEKQKKEKDDASDGMVSTSTKTGERDRDVHVGTSQTFTVPRIKSFPTDKMILPRIKGTIVLMLNH
kk	SKTEAVDAGLMEKLLKKEKQKKEKKEKQKKEKDDASDGMVSTSTKTGERDRDVHVGTSQTFTVPRIKSFPTDKMILPRIKGTIVLMLNH
rat	SKMEAVDAGLMEKLLKKEKQKKEKKEKQKKEKDDASDGMVSTSTKTGERDRDVHVGTSQTFTVPRIKSFPTDKMILPRIKGTIVLMLNH
home	SKTEAVDAGLMEKLLKKEKQKKEKKEKQKKEKDDASDGMVSTSTKTGERDRDVHVGTSQTFTVPRIKSFPTDKMILPRIKGTIVLMLNH
mild	SKMEAVDAGLMEKLLKKEKQKKEKKEKQKKEKDDASDGMVSTSTKTGERDRDVHVGTSQTFTVPRIKSFPTDKMILPRIKGTIVLMLNH
sev	SKMEAVDAGLMEKLLKKEKQKKEKKEKQKKEKDDASDGMVSTSTKTGERDRDVHVGTSQTFTVPRIKSFPTDKMILPRIKGTIVLMLNH
74	SKTEAVDAGLMEKLLKKEKQKKEKKEKQKKEKDDASDGMVSTSTKTGERDRDVHVGTSQTFTVPRIKSFPTDKMILPRIKGTIVLMLNH
88	SKTEAVDAGLMEKLLKKEKQKKEKKEKQKKEKDDASDGMVSTSTKTGERDRDVHVGTSQTFTVPRIKSFPTDKMILPRIKGTIVLMLNH
96	SKTEAVDAGLMEKLLKKEKQKKEKKEKQKKEKDDASDGMVSTSTKTGERDRDVHVGTSQTFTVPRIKSFPTDKMILPRIKGTIVLMLNH
75	SKTEAVDAGLMEKLLKKEKQKKEKKEKQKKEKDDASDGMVSTSTKTGERDRDVHVGTSQTFTVPRIKSFPTDKMILPRIKGTIVLMLNH
payp	LLQYMFQQIDISWTRATQSQFEKWTYEGVRNDYGLNDNEMQVLMNGLMVWCIEGTSFSDISGVVWMDGETQVDYPIKPLIEHATPSFRQI
aust	LLQYMFQQIDISWTRATQSQFEKWTYEGVRNDYGLNDNEMQVLMNGLMVWCIEGTSFSDISGVVWMDGETQVDYPIKPLIEHATPSFRQI
chum	LLQYMFQQIDISWTRATQSQFEKWTYEGVRNDYGLNDNEMQVLMNGLMVWCIEGTSFSDISGVVWMDGETQVDYPIKPLIEHATPSFRQI
kk	LLQYMFQQIDISWTRATQSQFEKWTYEGVRNDYGLNDNEMQVLMNGLMVWCIEGTSFSDISGVVWMDGETQVDYPIKPLIEHATPSFRQI
rat	LLQYMFQQIDISWTRATQSQFEKWTYEGVRNDYGLNDNEMQVLMNGLMVWCIEGTSFSDISGVVWMDGETQVDYPIKPLIEHATPSFRQI
home	LLQYMFQQIDISWTRATQSQFEKWTYEGVRNDYGLNDNEMQVLMNGLMVWCIEGTSFSDISGVVWMDGETQVDYPIKPLIEHATPSFRQI
mild	LLQYMFQQIDISWTRATQSQFEKWTYEGVRNDYGLNDNEMQVLMNGLMVWCIEGTSFSDISGVVWMDGETQVDYPIKPLIEHATPSFRQI
sev	LLQYMFQQIDISWTRATQSQFEKWTYEGVRNDYGLNDNEMQVLMNGLMVWCIEGTSFSDISGVVWMDGETQVDYPIKPLIEHATPSFRQI
74	LLQYMFQQIDISWTRATQSQFEKWTYEGVRNDYGLNDNEMQVLMNGLMVWCIEGTSFSDISGVVWMDGETQVDYPIKPLIEHATPSFRQI
88	LLQYMFQQIDISWTRATQSQFEKWTYEGVRNDYGLNDNEMQVLMNGLMVWCIEGTSFSDISGVVWMDGETQVDYPIKPLIEHATPSFRQI
96	LLQYMFQQIDISWTRATQSQFEKWTYEGVRNDYGLNDNEMQVLMNGLMVWCIEGTSFSDISGVVWMDGETQVDYPIKPLIEHATPSFRQI
75	LLQYMFQQIDISWTRATQSQFEKWTYEGVRNDYGLNDNEMQVLMNGLMVWCIEGTSFSDISGVVWMDGETQVDYPIKPLIEHATPSFRQI
payp	MAHFSMAARAYIAKRNATERYMPRYGIKRLTDISLARYAFDFYEVNSKTPDRAREAHQMKAAALRNTSRRMFGMDGSVSNKKEKTERH
aust	MAHFSMAARAYIAKRNATERYMPRYGIKRLTDISLARYAFDFYEVNSKTPDRAREAHQMKAAALRNTSRRMFGMDGSVSNKKEKTERH
chum	MAHFSMAARAYIAKRNATERYMPRYGIKRLTDISLARYAFDFYEVNSKTPDRAREAHQMKAAALRNTSRRMFGMDGSVSNKKEKTERH
kk	MAHFSMAARAYIAKRNATERYMPRYGIKRLTDISLARYAFDFYEVNSKTPDRAREAHQMKAAALRNTSRRMFGMDGSVSNKKEKTERH
rat	MAHFSMAARAYIAKRNATERYMPRYGIKRLTDISLARYAFDFYEVNSKTPDRAREAHQMKAAALRNTSRRMFGMDGSVSNKKEKTERH
home	MAHFSMAARAYIAKRNATERYMPRYGIKRLTDISLARYAFDFYEVNSKTPDRAREAHQMKAAALRNTSRRMFGMDGSVSNKKEKTERH
mild	MAHFSMAARAYIAKRNATERYMPRYGIKRLTDISLARYAFDFYEVNSKTPDRAREAHQMKAAALRNTSRRMFGMDGSVSNKKEKTERH
sev	MAHFSMAARAYIAKRNATERYMPRYGIKRLTDISLARYAFDFYEVNSKTPDRAREAHQMKAAALRNTSRRMFGMDGSVSNKKEKTERH
74	MAHFSMAARAYIAKRNATERYMPRYGIKRLTDISLARYAFDFYEVNSKTPDRAREAHQMKAAALRNTSRRMFGMDGSVSNKKEKTERH
88	MAHFSMAARAYIAKRNATERYMPRYGIKRLTDISLARYAFDFYEVNSKTPDRAREAHQMKAAALRNTSRRMFGMDGSVSNKKEKTERH
96	MAHFSMAARAYIAKRNATERYMPRYGIKRLTDISLARYAFDFYEVNSKTPDRAREAHQMKAAALRNTSRRMFGMDGSVSNKKEKTERH
75	MAHFSMAARAYIAKRNATERYMPRYGIKRLTDISLARYAFDFYEVNSKTPDRAREAHQMKAAALRNTSRRMFGMDGSVSNKKEKTERH
payp	TVEDVNRDMHSLGMRN*ILALVCLSGLARPCFTL*YYISIRIQCGCATASILQ*G*PSVLLVLFESSESPYSVGGPR
aust	TVEDVNRDMHSLGMRN*ILALVCLSGLARPCFTL*YYISIRIQCGCATASILQ*G*PSVLLVLFESSESPYSVGGPR
chum	TVEDVNRDMHSLGMRN*ILALVCLSGLARPCFTL*YYISIRIQCGCATASILQ*G*PSVLLVLFESSESPYSVGGPR
kk	TVEDVNRDMHSLGMRN*ILALVCLSGLARPCFTL*YYISIRIQCGCATASILQ*G*PSVLLVLFESSESPYSVGGPR
rat	TVEDVNRDMHSLGMRN*ILALVCLSGLARPCFTL*YYISIRIQCGCATASILQ*G*PSVLLVLFESSESPYSVGGPR
home	TVEDVNRDMHSLGMRN*ILALVCLSGLARPCFTL*YYISIRIQCGCATASILQ*G*PSVLLVLFESSESPYSVGGPR
mild	TVEDVNRDMHSLGMRN*ILALVCLSGLARPCFTL*YYISIRIQCGCATASILQ*G*PSVLLVLFESSESPYSVGGPR
sev	TVEDVNRDMHSLGMRN*ILALVCLSGLARPCFTL*YYISIRIQCGCATASILQ*G*PSVLLVLFESSESPYSVGGPR
74	TVEDVNRDMHSLGMRN*ILALVCLSGLARPCFTL*YYISIRIQCGCATASILQ*G*PSVLLVLFESSESPYSVGGPR
88	TVEDVNRDMHSLGMRN*ILALVCLSGLARPCFTL*YYISIRIQCGCATASILQ*G*PSVLLVLFESSESPYSVGGPR
96	TVEDVNRDMHSLGMRN*ILALVCLSGLARPCFTL*YYISIRIQCGCATASILQ*G*PSVLLVLFESSESPYSVGGPR
75	TVEDVNRDMHSLGMRN*ILALVCLSGLARPCFTL*YYISIRIQCGCATASILQ*G*PSVLLVLFESSESPYSVGGPR

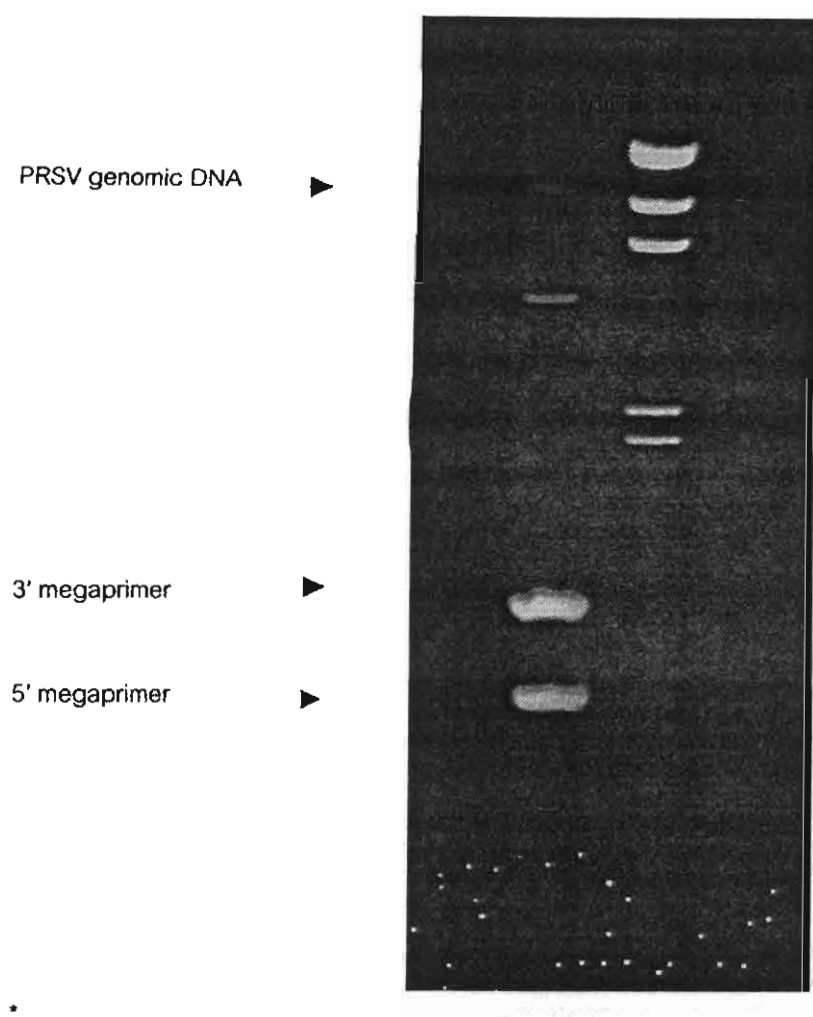
3. การทดลองสร้าง full length cDNA ของ PRSV ด้วยวิธี Long Accurate PCR

จากการทดลองพบว่าไม่สามารถใช้ primers ที่ออกแบบไว้ในการเพิ่มจำนวน full length cDNA ของ PRSV ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองค้นคว้าเพิ่มเติมเพื่อหาวิธีการที่เหมาะสม เนื่องจากได้มีรายงานว่าการใช้วิธี Long Accurate PCR ในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ให้ได้ผลนั้น ควรใช้ primers ที่มีขนาดไม่น้อยกว่า 30 bp มีจำนวนเบส G และ C ไม่น้อยกว่า 50% และมี Tm มากกว่า 60° C (Barnes, 1994) ซึ่งในการทดลองของเราที่ผ่านมา พบว่าทางปลายสุดด้าน 5' ของ PRSV มีปริมาณเบสชนิด A และ T สูงถึง 85% จึงไม่สามารถออกแบบ primers ทางด้าน 5' ให้มีจำนวนเบส G และ C ไม่น้อยกว่า 50% ได้ แม้ว่าจะพยายามออกแบบ primer ที่มีขนาดยาวกว่า 50 เบสก็ตาม ส่วน primer ที่ออกแบบสำหรับใช้ทางปลายด้าน 3' ไม่มีปัญหา โดยเราได้ทำการทดสอบใช้ primers ทั้ง 2 ปลายร่วมกับ primers ด้านในของ genome พบว่า primer ทางปลาย 3' สามารถใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอขนาด 3 kb จากปลายด้าน 3' ได้ไม่มีปัญหา ในขณะที่ primer ด้านปลาย 5' สามารถใช้เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้เพียงขนาด 760 bp และได้ปริมาณน้อยมาก เราได้ทดลองเปลี่ยนองค์ประกอบต่างๆที่เกี่ยวข้องในการทำปฏิกิริยา PCR ได้แก่ความเข้มข้นของ Mg ความเข้มข้นของ template รวมทั้งได้ทดลองลด extension temperature ของปฏิกิริยา PCR จาก 72° C เป็น 67° C ซึ่งมีรายงานว่าสามารถช่วยในการทำ PCR ของปฏิกิริยาที่มีปริมาณเบส A และ T สูง (Su et al, 1996) แต่พบว่าไม่สามารถใช้ primers นี้ในการเพิ่ม full length ของ PRSV ได้ ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมและได้ทดลองใช้วิธี megaprimers ในการเพิ่มจำนวน full length cDNA ของ PRSV

4. การทดลองใช้วิธี megaprimers ในการสร้าง full length cDNA

ผลการทดลองพบว่าวิธีนี้สามารถเพิ่มจำนวนแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 10 kb ซึ่งเป็น full length cDNA ของ PRSV และแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 4 kb ซึ่งอาจเป็น nonspecific PCR products จาก cDNA ของ PRSV ได้ (รูปที่ 10) โดยมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 521 bp และ 852 bp ซึ่งเป็น megaprimers ที่ใช้ในการทดลอง เนื่องจากแถบดีเอ็นเอขนาด 10 kb ที่ได้ยังมีปริมาณน้อย อาจเกิดจากความเข้มข้นของ megaprimers ที่ใช้ยังไม่เหมาะสม (Smith and Klugman, 1997; Barik and Galinski, 1991) ดังนั้นจะต้องทำการปรับปรุงให้ได้สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา เพื่อให้ได้ full length cDNA ของ PRSV มากขึ้น เพื่อใช้ในการ cloning ใน vector ที่มี T7 promoter ต่อไป

Fig 10. PCR amplification of PRSV genome using megaprimers



Lane 1: Amplified product

Lane 2: lambda *Hind* III marker

5. การตรวจสอบ PRSV type P สายพันธุ์อ่อน

จากการทดลองพบว่า PRSV type P สายพันธุ์อ่อนที่ได้รับจากกรมวิชาการเกษตรสามารถก่อให้เกิดโรคได้ในต้นมะละกอ โดยมีอาการรุนแรงเช่นเดียวกับสายพันธุ์รุนแรง แต่ใช้ระยะเวลาในการก่อโรคนานกว่าสายพันธุ์รุนแรง จึงสรุปว่าสายพันธุ์อ่อนที่ได้รับจากกรมวิชาการเกษตรเป็นน่าจะเป็น delay strain ไม่ใช่เป็น mild strain คือก่อให้เกิดโรครุนแรงแต่ใช้เวลาในการก่อโรคจนแสดงอาการมากกว่าสายพันธุ์รุนแรง (severe strain) นอกจากนี้ในการศึกษาเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนสร้างโปรตีนหุ้มอนุภาคไวรัส (virus coat protein gene) ของ PRSV สายพันธุ์รุนแรงและสายพันธุ์อ่อนที่ได้รับมาจากกรมวิชาการเกษตร พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก

ดังนั้น PRSV type P ชนิดสายพันธุ์อ่อนที่ได้รับมาจากกรมวิชาการเกษตรนี้ จึงไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการทดลอง ดังนั้นผู้วิจัยจึงจำเป็นต้องเปลี่ยนแผนงานโดยใช้ PRSV type W ซึ่งเดิมมีชื่อว่า watermelon ringspot virus ในการศึกษาแทน PRSV สายพันธุ์อ่อน

6. การตรวจสอบไวรัส PRSV type W

พบว่า PRSV type W สามารถก่อโรคในต้นแตงไทย แตงป่า และฟักทองได้ และไม่ก่อโรคในต้นมะละกอ ขณะที่ PRSV type P ก่อโรคในมะละกอ และแตงป่า แต่ไม่ก่อโรคในแตงไทยและฟักทอง

7. ศึกษาลำดับเบสของสารพันธุกรรมทางปลายสุดของด้าน 5' และ ปลาย 3' ของ papaya ringspot virus type W ด้วยวิธี RACE-PCR

สามารถทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมทางปลายสุดของด้าน 5' ได้ขึ้นดีเอ็นเอขนาด 300 เบส และทางปลายสุดของด้าน 3' ได้ขึ้นดีเอ็นเอขนาด 460 เบส จึงทำการตัดต่อเข้ากับพลาสมิดพาหะ pUC18 และนำไปศึกษาลำดับเบส พบว่าลำดับเบสจำนวน 44 เบสทางปลายสุดด้าน 5' และลำดับเบส จำนวน 71 เบสทางปลายสุดด้าน 3' มีความคล้ายคลึงกับของ PRSV type P คิดเป็น 100% (รูปที่ 11 และ 12)

รูปที่ 11. Comparison of 5' end sequence of Thai PRSV type P and W and isolate from Hawaii

5' PRSV-W Thai	AAATAAAACATCTCAACACAACACAATTCAAAGCATTCAAACACACTCAAGCAAATTTT
5' PRSV-P Thai	AAATAAAACATCTCAACACAACACAATTCAAAGCATTCAAACATACTCAAGCAAATTTT
5' PRSV-P Hawaii	AAATAAAACATCTCAACACAACATAATCAAAGTACTTCAACAAACATCAATTTATCTC ***** * * * * *
5' PRSV-W Thai	ATTCTCAAATTTCAACAATCTGCAAGCATGTCTTCGTTGTACCAATTGCAACCAATTGCAC
5' PRSV-P Thai	ATCTTCATAATTCAACAATTCGCAATCATGTCTTCATTGTACCAACTGCAACCGATAGCAC
5' PRSV-P Hawaii	ATTTTCAATTGTCAATAACAGCAACAATGTCTTCTTTGTACACTCTTCGAGCAGCAGCTC ** * * * * * * * * * * * * * * *
5' PRSV-W Thai	TGAAGGACCGTCTCTTGTCTCACAAGAGAGGAAAAGGTTGGATTGAGCACAAGCTCGAAA
5' PRSV-P Thai	TGAAGGACCGTCTCTTGGCTCACAAAAAGGGAAAGGCTGGATTGAGCACAAGCTTGAAA
5' PRSV-P Hawaii	AGTACGATAGGAGGTTGGAAAGCAAGAAAGGTTCTGGTTGGGTCGAGCACAACCTCGAAA * * * * * * * * * * * * * * *
5' PRSV-W Thai	GGAAAGGAGAGAGAGGAAACACTCGTCATGTTGGCGAGTTTGTGATCAGTGAGGGAGCAA
5' PRSV-P Thai	GAAAAGGGGACAGAGGAAACACTCCTCATGTTGGCGAGTTCTGTAGTTAGTGAAGGAGCTA
5' PRSV-P Hawaii	GGAAAGGTGAGAGAGGAAACACTCACTATTGTAGTAGTGTGACATTAGTAAGGGTGCCA * * * * * * * * * * * * * * *
5' PRSV-W Thai	AAATTTTGCAACTCGTGCAAAATTGGAAACGCTGAAATTGGCAGGACCTTCCTGGAAGGTG
5' PRSV-P Thai	AAATTCTACAACTCATCCAAATTGGGAACGCTGAAGTGGGCAGGGCATTCCTAGAAGGCG
5' PRSV-P Hawaii	AAATCCTGCAATTGGTGCAGATTGGTAACACTGAAGTTGGAAGGACCTTCCTGGAAGGTA **** * * * * * * * * * * * * * * *

รูปที่ 12. Comparison of 3' end sequences of Thai PRSV type P and W and isolate from Hawaii

PRSV-W Thai	AGAGGCATACATCGCGAAGAGGAATGCAACTGAGAGGTACATGCCGCGGTATGGAATCAA
PRSV-P Thai	AGAGGCATACATCGCGAAGAGGAACGCAACCGAGAGGTACATGCCGCGGTATGGGATCAA
PRSV-W Hawaii	AGAAGCATACATTGCGAAAAGAAATGCTACTGAGAGGTACATGCCGCGGTATGGAATCAA
	*** *****
PRSV-W Thai	GAGGAATTTGACTGACATTAGCCTCGCTAGATATGCTTTTCGATTTCTATGAGGTGAATTC
PRSV-P Thai	GAGAAATTTGACTGACATTAGTCTCGCTAGATACGCTTTTCGATTTCTATGAGGTGATTC
PRSV-W Hawaii	GAGAAATTTGACTGACATTAGCCTCGCTAGATACGCTTTTCGACTTCTATGAGGTGAATTC
	*** *****
PRSV-W Thai	AAAAACACCTGATAGGGCTCGTGAAGCTCATATGCAGATGAAAGCTGCAGCACTACGCAA
PRSV-P Thai	AAAAACGCTGATAGAGCTCGTGAAGCTCATATGCAGATGAAAGCTGCAGCGCTGCGCAA
PRSV-W Hawaii	GAAAACACCTGATAGGGCTCGCGAAGCCACATGCAGATGAAGGCTGCAGCACTGCGAAA

PRSV-W Thai	TACTGGTCGTAGAATGTTTGAATGGACGGCAGTGTCTAGTAACAAGGAAGAAAACACGGA
PRSV-P Thai	TGCTAGTCGCAGAATGTTTGAATGGACGGCAGTGTCTAGTAACAAGGAAGAAAACACGGA
PRSV-W Hawaii	CACTAGTCGCAATGTTTGGTATGGACGGCAGTGTCTAGTAACAAGGAAGAAAACACGGA
	** *****
PRSV-W Thai	GAGACACACAGTGAAGATGTCAACAAAGACATGCACCTCTCTCCTGGGTATGCGCAATTG
PRSV-P Thai	GAGACACACAGTGAAGATGTCAACAGAGACATGCACCTCTCTCCTGGGTATGCGCAATTG
PRSV-W Hawaii	GAGACACACAGTGAAGACGTCAATAGAGACATGCACCTCTCTCCTGGGTATGCGCAACTA

PRSV-W Thai	AATACTCGCGCTAGTGTGTTTCGTCGGGCTGGCTCGACCTGTTTCACCTTATAATACTA
PRSV-P Thai	AATACTCGCGCTAGTGTGTTTATCGGGCTGGCTCGAACCTGTTTCACCTTATAGTACTA
PRSV-W Hawaii	AATACTTCGCGCTTGTGTGTTTGTCTGAGCTTGACTCGACCTGTTTCACCTTATAGTACTA

PRSV-W Thai	TATAAGCATTAGAATACAGTGTGGCTGCGCCACCGCTTCTATTTTACAGTGAGGGTAGCC
PRSV-P Thai	TATAAGCATTAGAATACAATGTGGCTGCGCCACCGCTTCTATTTTACAGTGAGGGTAGCC
PRSV-W Hawaii	TATAAGCATTAGAATACAGTGTGGCTGCGCCACCGCTTCTATTTTACAGTGAGGGTAGCC

PRSV-W Thai	CTCCGTGCTTTTAGTGTATTTCGAGTTCTCTGAGTCTCCATACAGTGTGGGTGGCCCACG
PRSV-P Thai	CTCCGTGCTTTTAGTATTATTTCGAGTTCTCTGAGTCTCCATACAGTGTGGGTGGCCCACG
PRSV-W Hawaii	CTCCGTGCTTTTAGTATTATTTCGAGTTCTCTGAGTCTCCATACAGTGTGGGTGGCCCACG

PRSV-W Thai	TGCTATTTCGAGCCTCTTAGAATGAGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-----
PRSV-P Thai	TGCTATTTCGAGCCTCTTAGAATGAGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
PRSV-W Hawaii	TGCTATTTCGAGCCTCTTAGAATGAGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-----

รูปที่ 13. Primer design to obtain full length clone of both type P and type W

5' end primer (T7GENF)

5'- TAATACGACTCACTATAGAAATAAAAACATCTCAACACAACACAA -3'

Underlined sequence is T7 promoter. An extra G was inserted for transcriptional start from T7.

3' end primer (GENR)

5- CTCTCATTCTAAGAGGCTCGAATAGCACGTGGG -3'

5' CP primer

5'- CATCATCATCATATCATTCCATGGCTGTGGATGCTGGTTTGAATG -3'

GSP2 primer

5'- CGAAGGATCCGTCCATGCCTCTTCAACTTT -3'

UTR primer

5'- CGCCTCGAGAAATAAAAACATCTCAACA -3'

8. การเพิ่มจำนวน full length cDNA ของ PRSV type P และ type W

ได้พบว่าเมื่อใช้ primers ที่ออกแบบใหม่ร่วมกับใช้เอนไซม์ Expand Taq RT PCR (Boehringer) สามารถใช้ทำปฏิกิริยาเพิ่มจำนวน full length cDNA ของ PRSV type P และ type W ได้จำนวนมาก จึงได้ปรับปรุงให้ primers นี้ มี T7 promoter อยู่ทางปลายด้าน 5' และมีการเพิ่มเบส G ตามหลัง T7 promoter เพื่อใช้ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา transcription (รูปที่ 13) และได้ใช้ primers ชุดนี้ในการทำปฏิกิริยาเพิ่มจำนวน full length cDNA ของ PRSV type P และ type W โดยวิธี PCR พบว่าสามารถเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอขนาด 10.3 กิโลเบสได้ (รูปที่ 14 และ 15) จากการทดสอบโดยทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอปลายสุดด้าน 5' และ 3' ของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primers ที่จำเพาะกับ PRSV และทดสอบตัดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ได้เป็นของไวรัส PRSV จริง

รูปที่. 14. Amplification of the full-length cDNA of PRSV, type W and type P with Expand Reverse Transcriptase and Expand Long Template PCR polymerase



M: λ HindIII marker

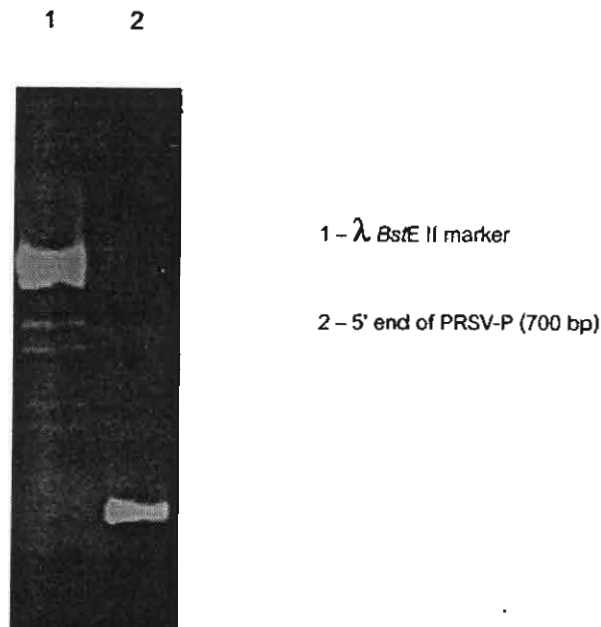
W: 10.3 kb PRSV-W cDNA



M: λ HindIII marker

P: 10.3 kb PRSV-P cDNA

รูปที่ 15. PCR amplification of the 700 bp DNA fragment of the 5' end of PRSV genome



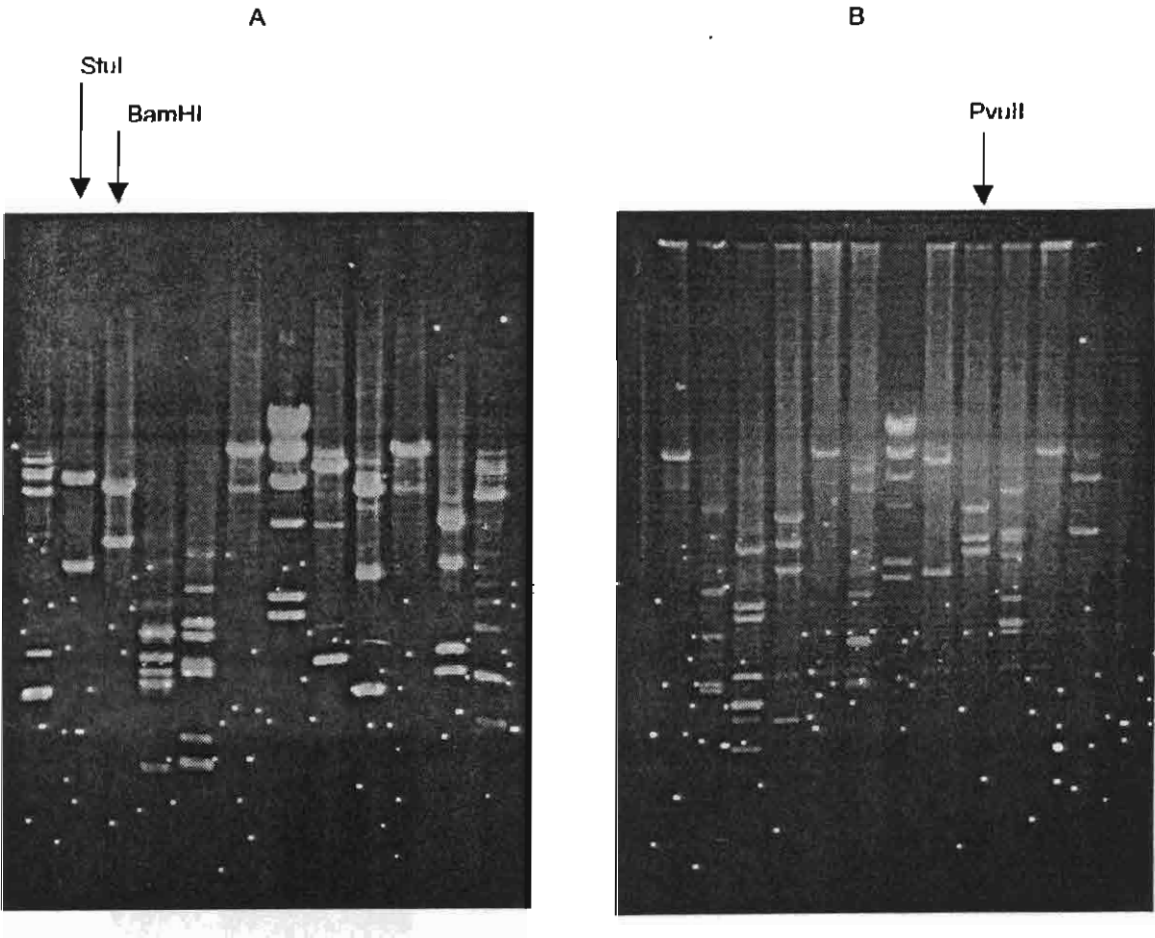
9. การเติมปลาย poly A tailing และการโคลน full length genome เข้าสู่พลาสมิดพาหะ

พบว่าวิธีนี้ไม่สามารถใช้ในการโคลน full length genome เข้าสู่พลาสมิดพาหะได้ เนื่องจากไม่สามารถได้ recombinant clone ตามที่คาดหวัง

10. การศึกษา restriction enzyme mapping ของ full length cDNA ของ PRSV type P

ทดลองใช้ restriction enzymes *Bam*HI, *Kpn*I, *Nar*I, *Not*I, *Pac*I, *Pvu*II, *Sac*I, *Sma*I, *Stu*I, *Xba*I และ *Xho*I ในการตัด full length cDNA ของ PRSV type P พบว่า restriction enzymes ที่มีจุดตัดเพียง 1 แห่ง ได้แก่ เอนไซม์ *Xho*I, *Bam*HI, *Nar*I, *Pac*I และ *Stu*I ที่มีจุดตัด 2 แห่ง ได้แก่ *Pvu*II และ *Sac*I สำหรับเอนไซม์ *Sma*I, *Kpn*I, *Xba*I และ *Not*I ไม่สามารถตัด full length cDNA ของ PRSV type P ได้ ทำการเลือกจุดตัดที่เหมาะสมในการใช้ cloning โดย enzymes บางตัวเพิ่มเติม (รูปที่ 16 A และ B) พบว่า enzymes ที่เหมาะสมในการใช้ cloning คือ) enzyme *Pvu*II ซึ่งมีจุดตัดที่ตำแหน่ง 3400 เบส และ 6000 เบสห่างจากปลายด้าน 5' enzyme *Stu*I ซึ่งมีจุดตัดที่ตำแหน่ง 3400 เบส ห่างจากปลายด้าน 5' enzyme *Bam*HI ซึ่งมีจุดตัดที่ตำแหน่ง 6400 เบส ห่างจากปลายด้าน 5' และ enzyme *Sac*I ซึ่งมีจุดตัดที่ตำแหน่ง 400 เบส และ 10,000 เบสห่างจากปลายด้าน 5' (รูปที่ 17)

Fig. 16. Restriction enzyme analysis of the amplified PRSV genome, type P.



11. การ clone ชิ้นย่อยของ full length cDNA ของ PRSV type P

ได้ออกแบบ primers เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นย่อยของ full length cDNA ของ PRSV type P จำนวน 3 ชิ้นย่อย คือ ส่วนของ ปลายด้าน 5' ปลายด้าน 3' และส่วนกลาง (รูปที่ 17) และใช้ enzymes Expand RT PCR ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (รูปที่ 18) และตัดต่อดีเอ็นเอเข้าไปในพลาสมิด pUC18 โดยวิธี blunt end cloning ดังที่แสดงในรูปที่ 19 โดยส่วนปลายด้าน 5' ตัดต่อเข้าไปในพลาสมิด pUC19 ที่ตัดด้วย enzyme *Sma*I ขณะที่ส่วนปลายด้าน 3' และส่วนกลางตัดต่อเข้าไปในพลาสมิด pUC19 ที่ตัดด้วย enzyme *Pvu*II (รูปที่ 20 และ 21) นำพลาสมิดลูกผสมที่ได้ไปศึกษาลำดับเบสเพื่อให้ได้ clone ที่มีลำดับเบสที่ถูกต้องและมีตำแหน่งของจุดตัด enzyme ตามที่ได้ศึกษาไว้ (รูปที่ 22A, B และ C) พบว่าเมื่อนับจากปลายด้าน 5' ตำแหน่งจุดตัดของ enzyme *Pvu*II อยู่ที่ตำแหน่ง 3,484 เบส และ 6,092 เบส จุดตัดของ enzyme *Bam*HI อยู่ที่ตำแหน่ง 6,592 เบส จุดตัดของ *Sma*I อยู่ที่ตำแหน่ง 3,498 เบส

ขณะนี้กำลังอยู่ในระหว่างการเชื่อมต่อชิ้นย่อยที่ได้นี้เป็น full length cDNA ของ PRSV type P

Fig 17. PCR primers and considered restriction enzyme sites

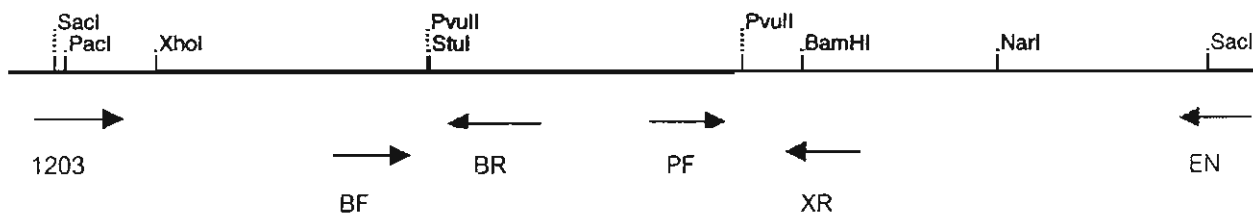


Fig. 18. PCR Amplification of three overlapping PRSV fragments

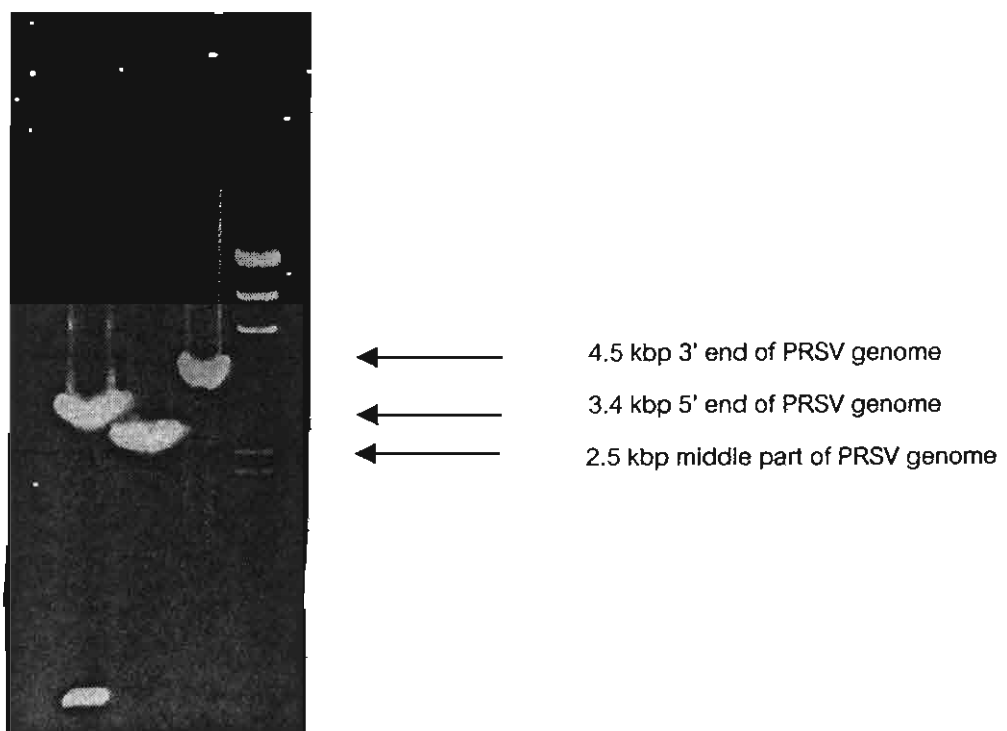


Fig. 19. Cloning of the 5' end fragment of PRSV

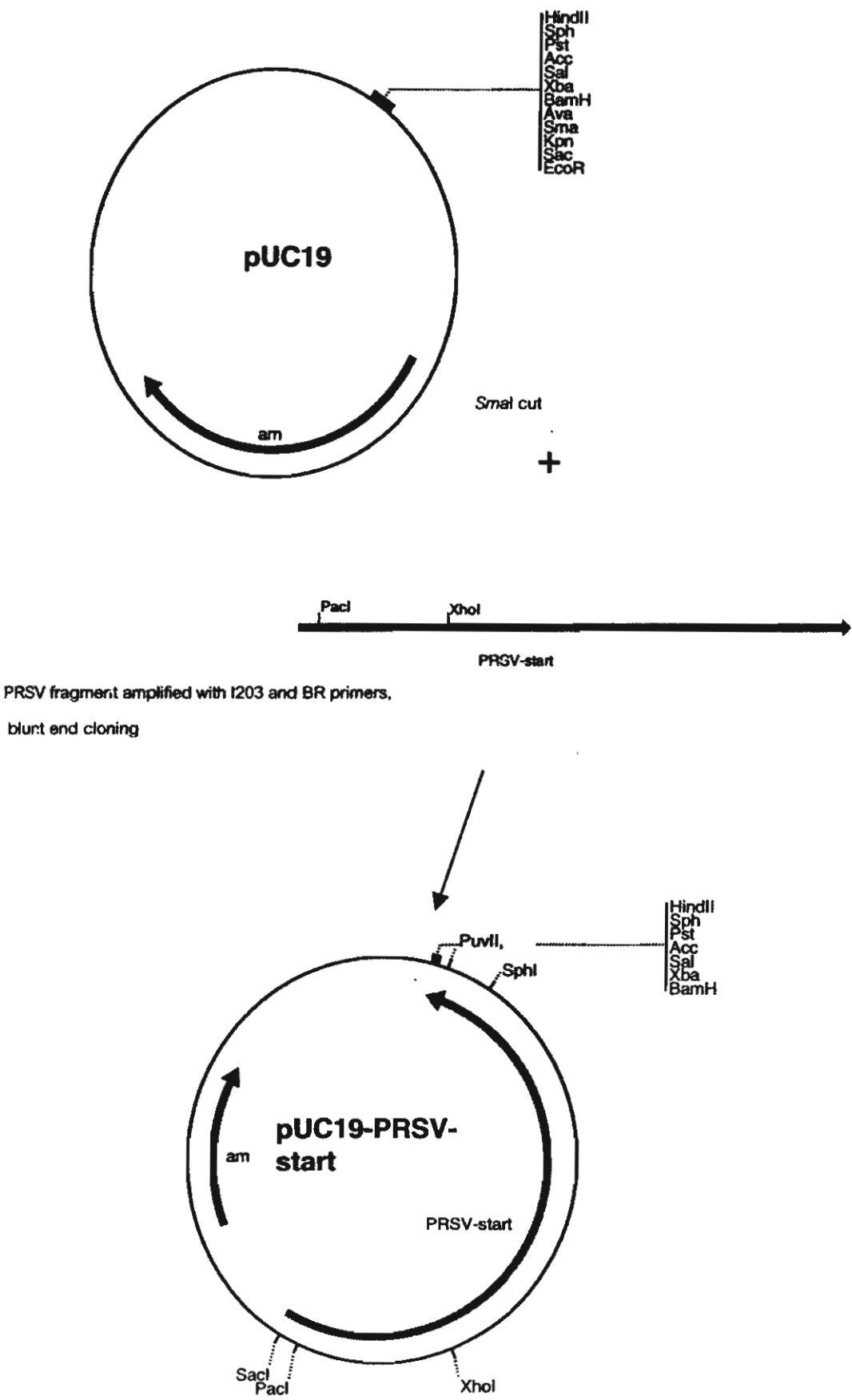
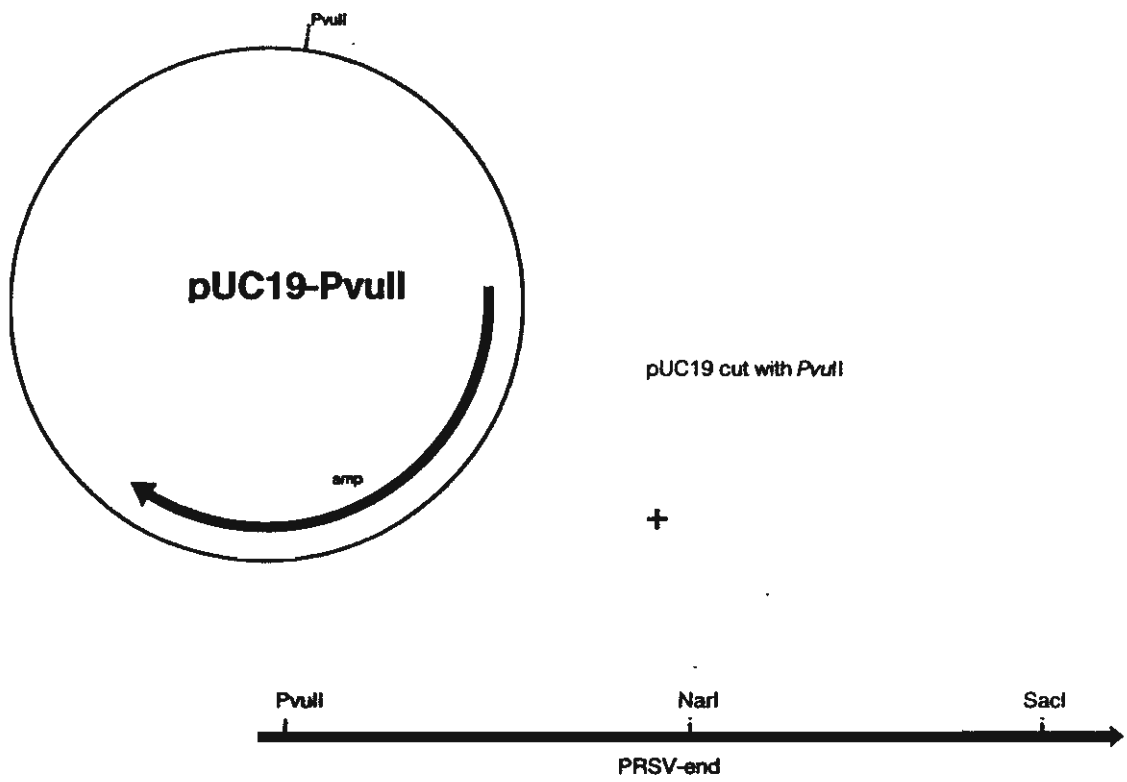


Fig 20. Cloning of the 3' end part of the PRSV fragment



PRSV fragment amplified with PF and EN primers,
phosphorylated and blunt end cloning

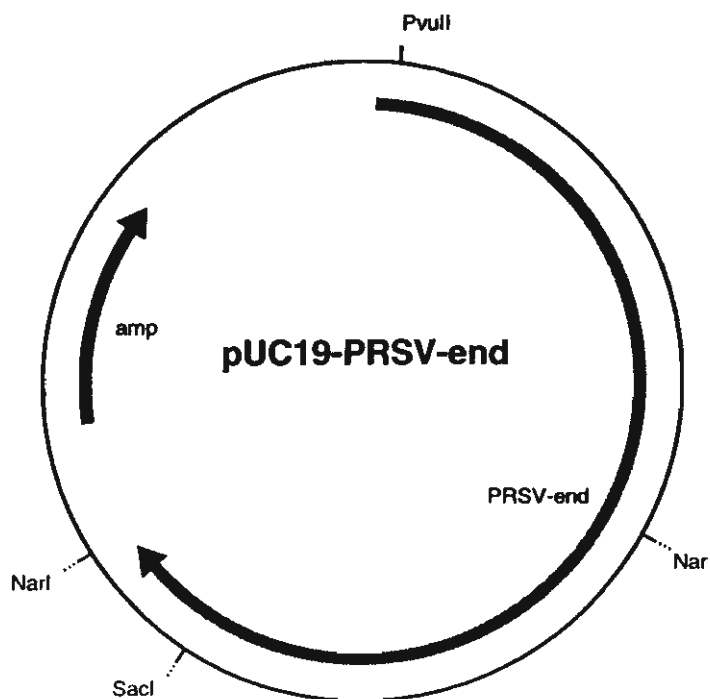
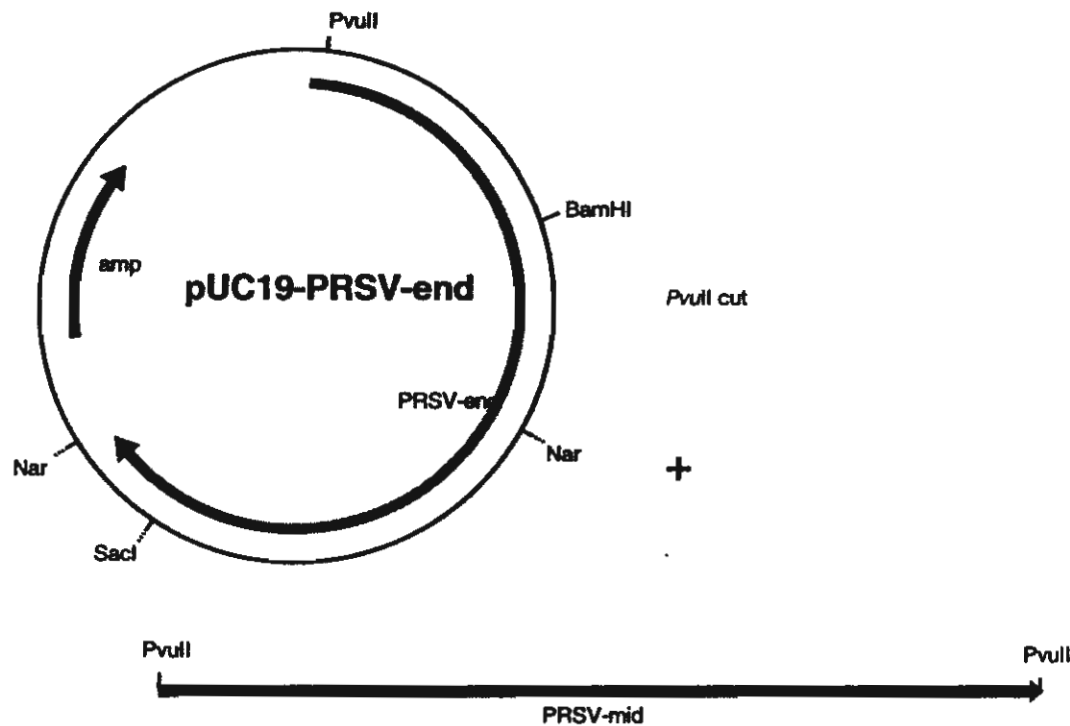


Fig. 21. Cloning the middle part of PRSV fragment – ligation with the 3' end sequence



PRSV fragment amplified with BF and XR primers and digested with *PvuII*

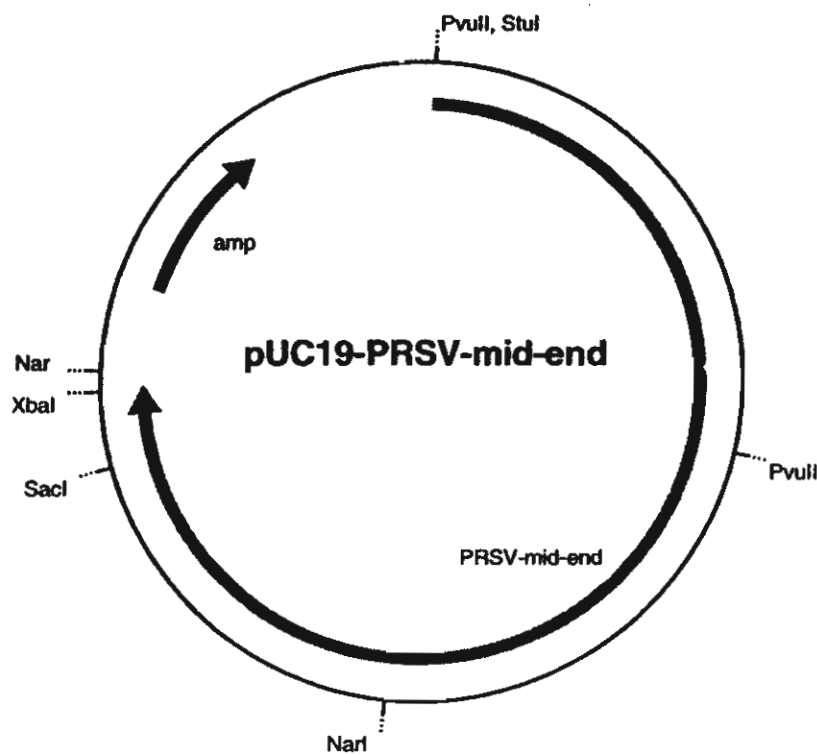
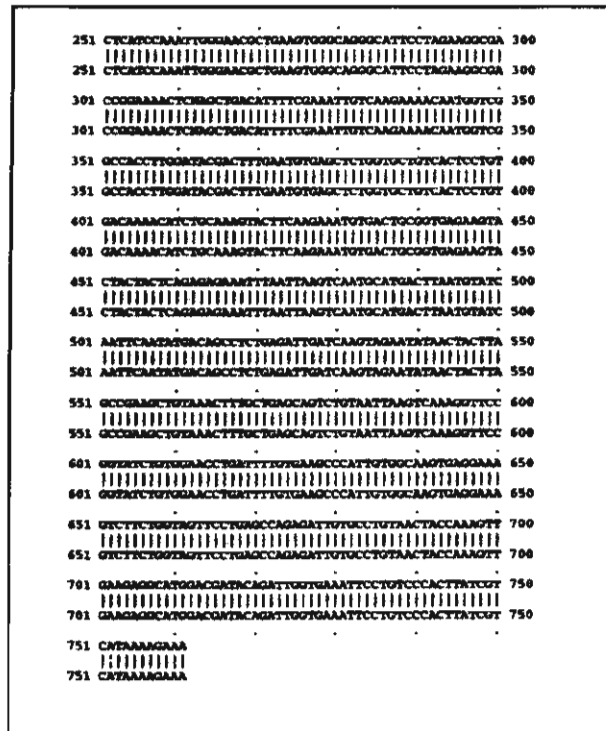
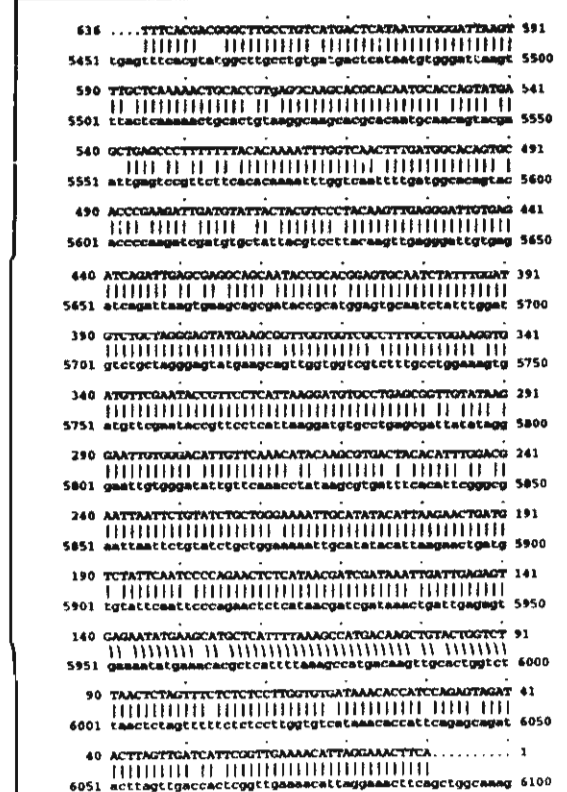
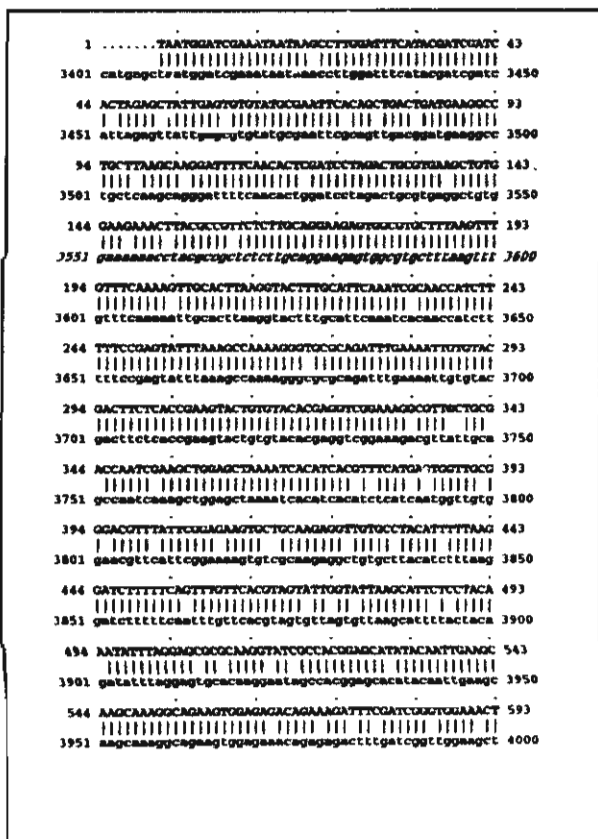


Fig. 22. Sequence homology of amplified fragments of PRSV with known DNA sequence.

A) 5' end of PRSV sequence



B) Middle part of PRSV sequence



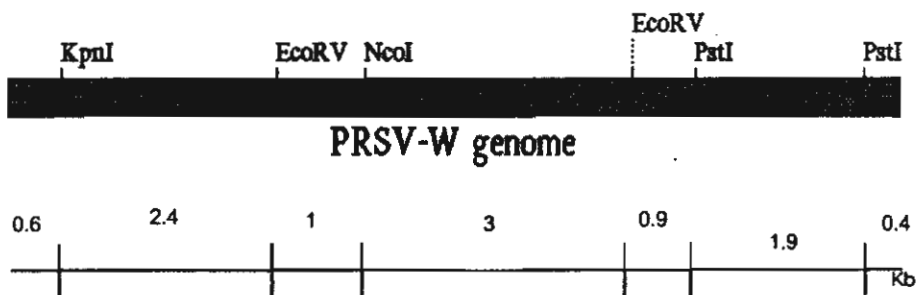
[illegible]

684CGGCTCTGATGATGACGAAATCTGTTTATGT 653
9601 GCGACTGAGCAATGATATGAGCTCTATATGATACGAAATCTGTTTATGT 9650
652 TAAATGGTCTATATGGTTTGGTGATCTGAAAAATGATGACATCTCGGACAT 604
9651 TAAATGGTCTATATGGTTTGGTTGATGCAAAATGATGACATCTCGGACAT 9700
603 TCTGCTGCTCTGGGZATGAGGGGTGGGAAATCTCAAGTGAATATCCGCT 554
9701 TCTGCTGCTCTGGGZATGAGGGGTGGGAAATCTCAAGTGAATATCCGCT 9750
553 CAAACCTTTGATTGACATGGAACCTCTCTATTCAAGCAAAATCATGGCT 504
9751 CAAACCTTTGATTGACATGGAACCTCTCTATTCAAGCAAAATCATGGCT 9800
503 ACTTCAGTAAAGGCTGAGGATCATCTCTGGAGAGAGGAGGCTCCAGCG 454
9801 ACTTCAGTAAAGGCTGAGGATCATCTCTGGAGAGAGGAGGCTCCAGCG 9850
453 AGGTTCATGCGCGGCTGAGATCAGAGGAATTTTGATGACATATGCTCT 404
9851 AGGTTCATGCGCGGCTGAGATCAGAGGAATTTTGATGACATATGCTCT 9900
403 CGCTGATATGCTTTGCTTTCTATGAGTGTGATTCAGAAACGCCATGATA 354
9901 CGCTGATATGCTTTGCTTTCTATGAGTGTGATTCAGAAACGCCATGATA 9950
353 GAGCTCTGTAGGCTCTATGTCGATGTAAGAGCTGCAGCGCTGCGCAATGCT 304
9951 GAGCTCTGTAGGCTCTATGTCGATGTAAGAGCTGCAGCGCTGCGCAATGCT 10000
303 AGTCCGAGATGTTTGAAGAGGAGCGGCACTGTCAGTACAGAGAGAGAAA 254
10001 AGTCCGAGATGTTTGAAGAGGAGCGGCACTGTCAGTACAGAGAGAGAAA 10050
253 CACGAGAGAGACACAGATGGAGATGTCACAGAGACATGCACTCTCTCC 204
10051 CACGAGAGAGACACAGATGGAGATGTCACAGAGACATGCACTCTCTCC 10100
203 TGGGTATGCGCAATGAAATCTCGCGCTAGTGTTTATCGGACATGCTCT 154
10101 TGGGTATGCGCAATGAAATCTCGCGCTAGTGTTTATCGGACATGCTCT 10150
153 CGAACCTGTTTCACCTTATGATGATGATATGAGCATATCAATCAATGTGG 104
10151 CGAACCTGTTTCACCTTATGATGATGATATGAGCATATCAATCAATGTGG 10200
103 CTGGACACACGCTCTATGATGAGGCTGAGGCTCTGCTCTTTTGG 54
10201 CTGGACACACGCTCTATGATGAGGCTGAGGCTCTGCTCTTTTGG 10250
53 TATGATTCAGGTTCTCTGATCTCCATACAGTGGAGGAGGCCA4
10251 TATGATTCAGGTTCTCTGATCTCCATACAGTGGAGGAGGCCAATGCTCT 10300

12. การศึกษา restriction enzyme mapping ของ full length cDNA ของ PRSV type W

ทดลองใช้ restriction enzymes *EcoRV*, *KpnI*, *NcoI*, *PstI* ในการตัด full length cDNA ของ PRSV type W พบว่าเอนไซม์ *KpnI* และ *NcoI* มีจุดตัดเพียง 1 แห่ง ที่ตำแหน่งประมาณ 600 เบส และ 4000 เบส จากปลายด้าน 5' ตามลำดับ เอนไซม์ *EcoRV* มีจุดตัด 2 แห่ง ที่ตำแหน่งประมาณ 3000 เบส และ 7000 เบส ห่างจากปลายด้าน 5' เอนไซม์ *PstI* มีจุดตัด 2 แห่ง ที่ตำแหน่งประมาณ 7900 เบส ห่างจากปลายด้าน 5' และประมาณ 400 เบสจากปลายด้าน 3' (รูปที่ 23)

Fig. 23. Restriction enzyme analysis of the amplified PRSV genome, type W.



13. การ clone ชิ้นย่อยของ full length cDNA ของ PRSV type W

ได้ทำการ clone ชิ้นย่อยของ full length cDNA ของ PRSV type W ดังนี้

13.1 ใช้ primers ที่จำเพาะกับปลายด้าน 5' ของ cDNA (T7GENF และ GSP2) ในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 เบส ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้นี้มี T7 promoter อยู่ทางด้านปลายสุด 6' ทำการตัดต่อชิ้นดีเอ็นเอนี้เข้ากับพลาสมิด pUC18 *SacI*/T4 DNA polymerase พลาสมิดที่ได้คือ pSA1067 (รูปที่ 24)

13.2. ใช้เอนไซม์ T4 DNA polymerase ทำปฏิกิริยา fill in กับ full length cDNA ของ PRSV type W แล้วตัดด้วยเอนไซม์ *NcoI* จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 4000 เบส เชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ได้เข้ากับพลาสมิด pAMP ที่ตัดด้วย *KpnI*/T4 DNA polymerase/*NcoI* พลาสมิดที่ได้คือ pSA1068 (รูปที่ 25)

Fig 24. Cloning of the 700 bp fragment attach to the T7 promoter at the 5' end of PRSV type W,

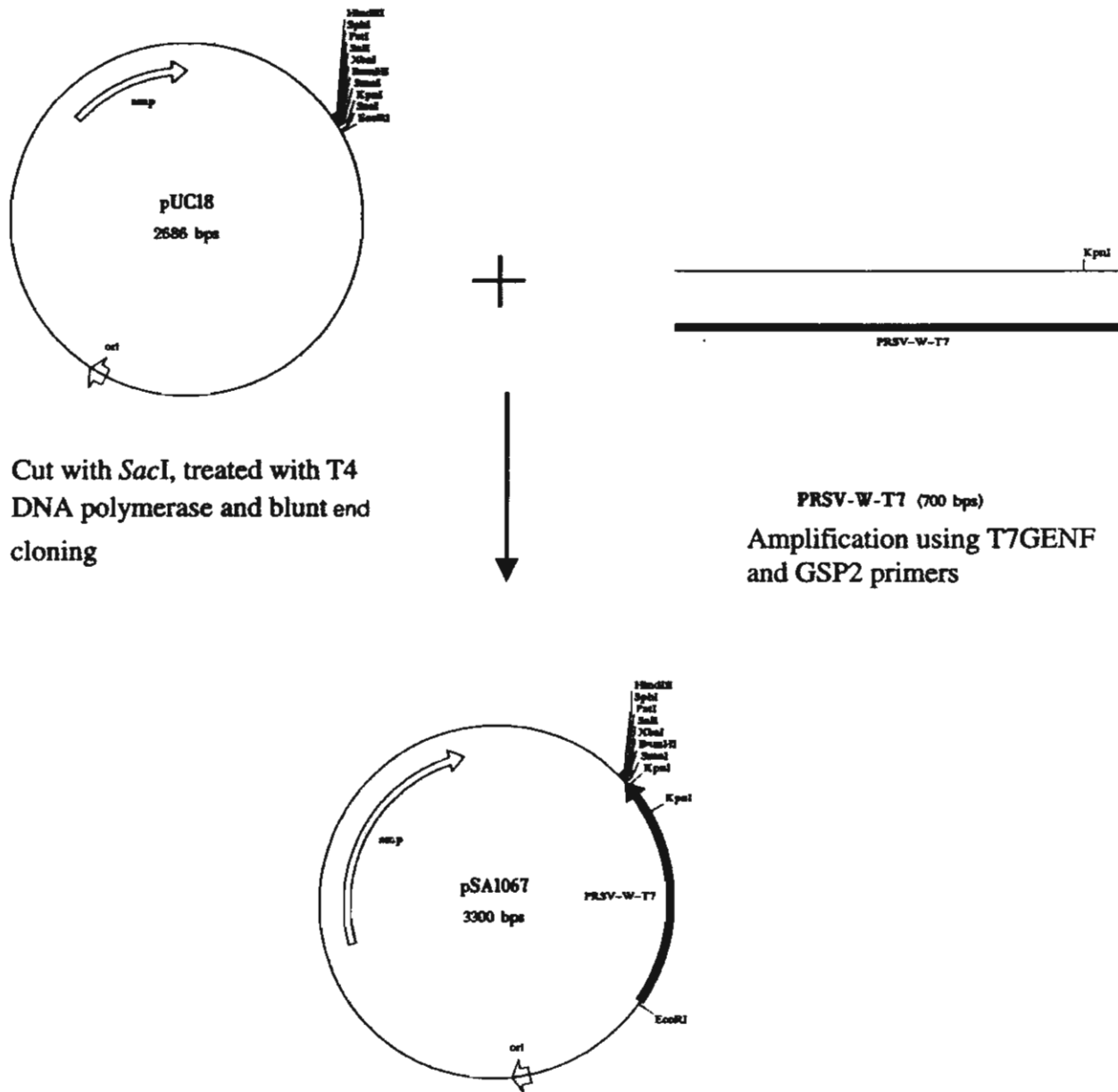
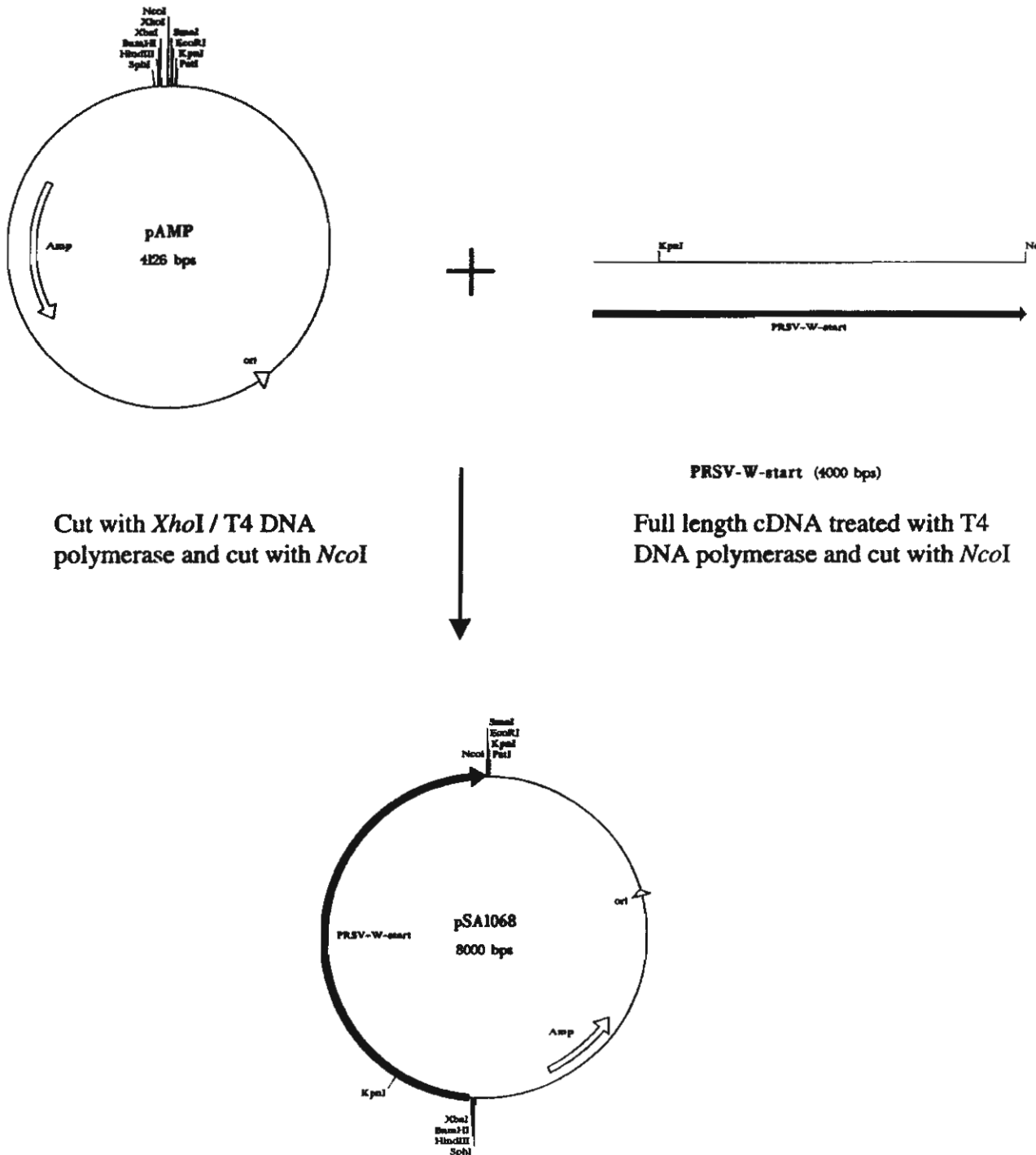


Fig. 25. Cloning of the 4 kb fragment at the 5' end of the PRSV type W



13.3 การเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอด้านปลาย 5' ขนาดประมาณ 4000 เบสเข้ากับ T7 promoter

ทำการตัดพลาสมิด pSA1068 ด้วยเอนไซม์ *KpnI/SmaI* แยกชิ้นดีเอ็นเอของ PRSV type W ขนาดประมาณ 3300 เบส เชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pSA1067 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *KpnI/SmaI* ได้ พลาสมิด คือ pSA1076 (รูปที่ 26) ตรวจสอบพลาสมิดที่ได้โดยการตัดด้วย *KpnI/SmaI* (รูปที่ 27) จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3300 เบส 2 ชิ้น (เห็นเป็น band เดียว) และตัดด้วย *NcoI* จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 6600 เบส

Fig. 26. Cloning of the 4 kb fragment at the 5' end of the PRSV type W to the T7 promoter

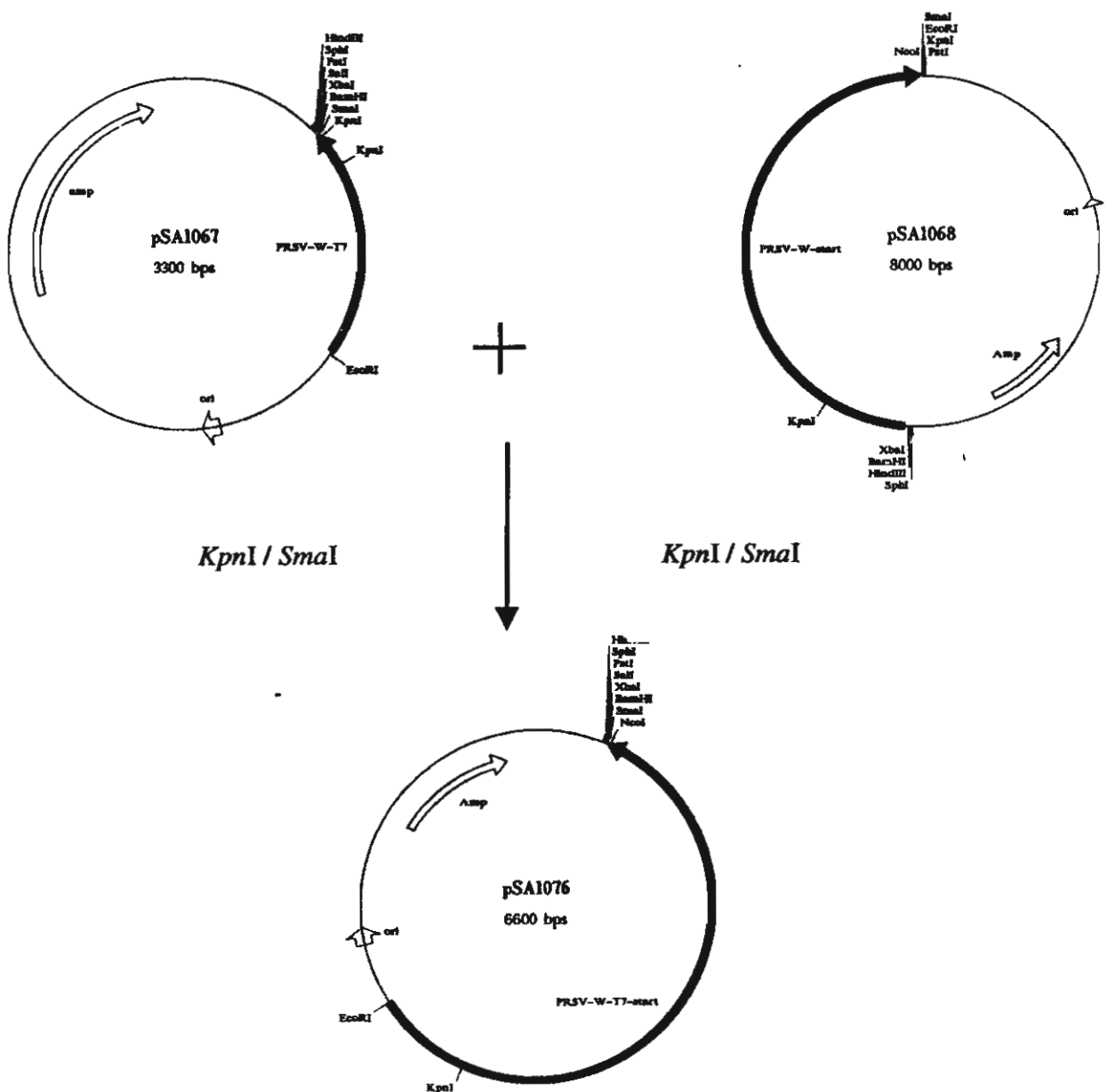
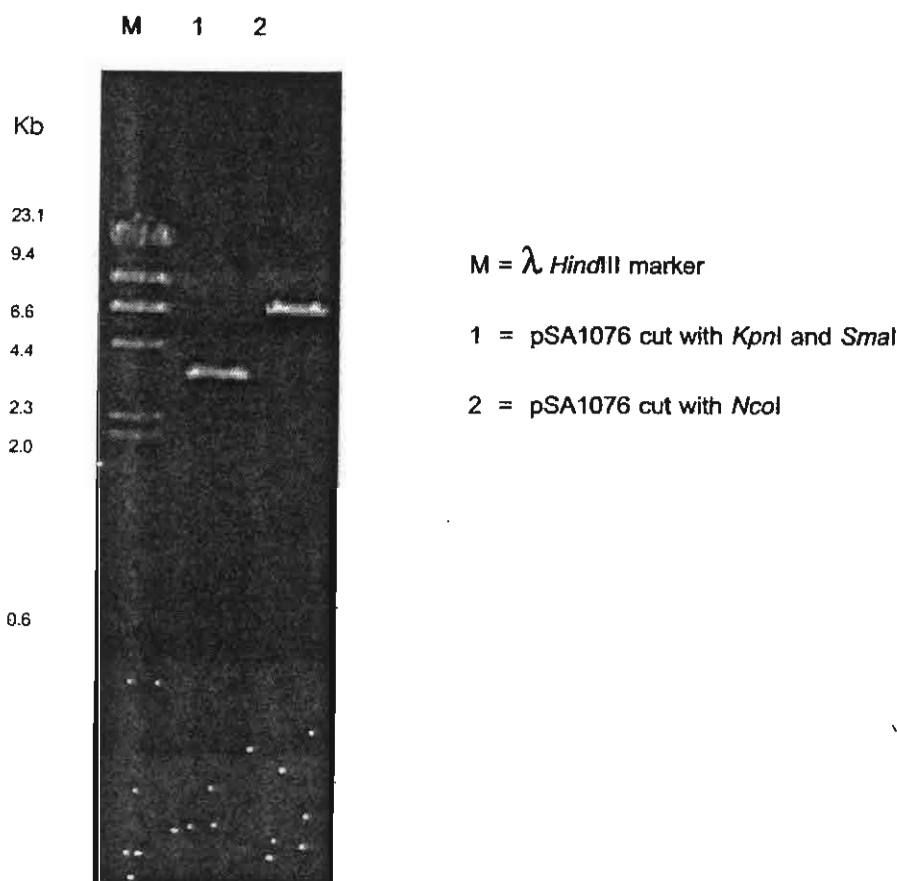


Fig. 27. Restriction enzyme analysis of pSA 1076 by digestion with *KpnI*/*SmaI* and *NcoI*.



13.4. การ clone ชิ้นดีเอ็นเอทางด้านปลาย 3' ของ full length cDNA ของ PRSV type W

ใช้ primers ที่จำเพาะกับปลายด้าน 3' ของ full length cDNA ของ PRSV type W ทำการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1300 เบส ทำการเติม polyA เข้าที่ปลาย 3' ของชิ้นดีเอ็นเอ โดยใช้เอนไซม์ terminal transferase และ dATP ทำการ clone ชิ้นดีเอ็นเอนี้เข้ากับพลาสมิด pUC18 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *SmaI* และเติม dTTP โดยใช้เอนไซม์ terminal transferase (รูปที่ 28) พลาสมิดที่ได้คือ pSA1071 ตรวจสอบพลาสมิดที่ได้โดยการตัดด้วย *KpnI*/*BamHI* จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1300 เบส และ 2600 เบส และตัดด้วย *PstI* จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 600 เบส และ 3300 เบส (รูปที่ 29) แสดงว่าพลาสมิดที่ได้อยู่ในตำแหน่งที่ถูกต้อง

Fig. 28. Cloning of the 1.3 kb fragment at the 3' end of the PRSV type W.

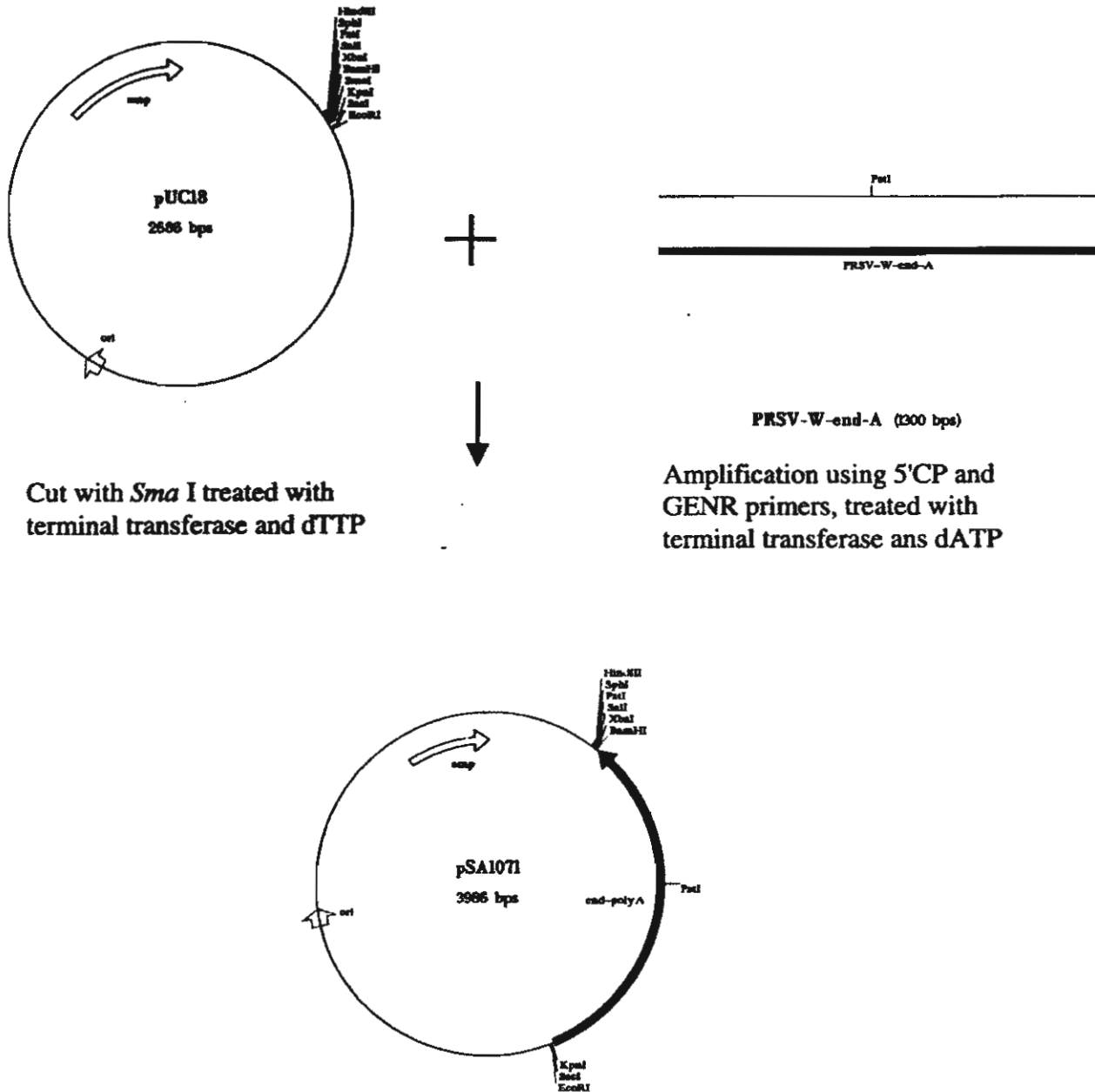
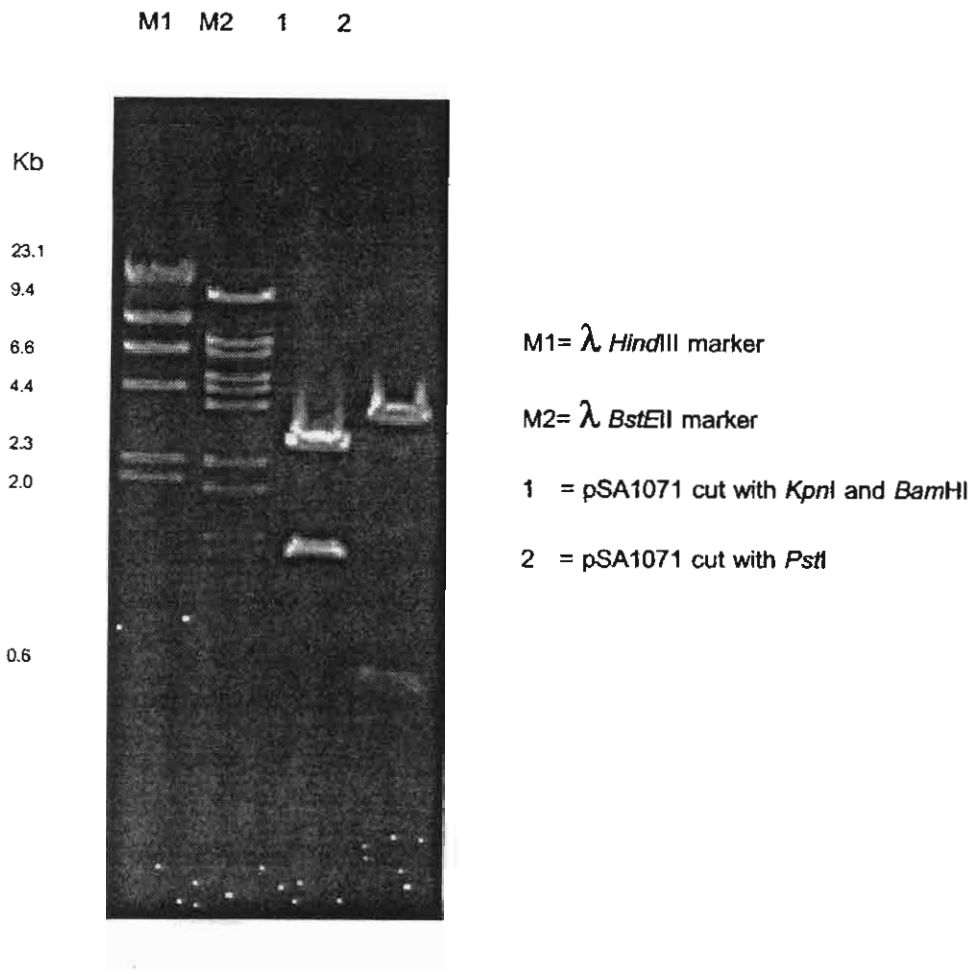


Fig. 29. Restriction enzyme analysis of pSA1071



13.5. การ clone ชิ้นดีเอ็นเอชิ้นกลางและชิ้นปลายของ full length cDNA ของ PRSV type W

ใช้เอนไซม์ *EcoRV* ตัด full length cDNA ของ PRSV type W จะได้ชิ้นดีเอ็นเอชิ้นกลางที่มีขนาดประมาณ 4000 เบส และชิ้นปลายด้าน 3' ที่มีขนาดประมาณ 3000 เบส ตัดต่อดีเอ็นเอชิ้นกลางและชิ้นปลายเข้ากับพลาสมิด pBlueSK ที่ตัดด้วย *EcoRV* และทำปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ Calf intestinal phosphotransferase (cip) ได้พลาสมิด pSA1093 และ pSA1094 ตามลำดับ (รูปที่ 30) เมื่อตรวจสอบพลาสมิด pSA1093 ที่ได้โดยการตัดด้วย *EcoRV* จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 4000 เบส และ 3000 เบส และตัดด้วย *PstI* จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1000 เบส และ 6000 เบส (รูปที่ 31) ตรวจสอบพลาสมิด pSA1094 ที่ได้โดยการตัดด้วย *EcoRV* จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 6000 เบส และตัดด้วย *PstI* จะได้ชิ้นดีเอ็นเอ 3 ชิ้น ขนาด 3700 เบส 1900 เบส และ 400 เบส (รูปที่ 32) แสดงว่าพลาสมิดที่ได้ทั้งสองพลาสมิดถูกต้อง

Fig. 30. Cloning o the middle and 3' end fragments of the full length cDNA of PRSV type W

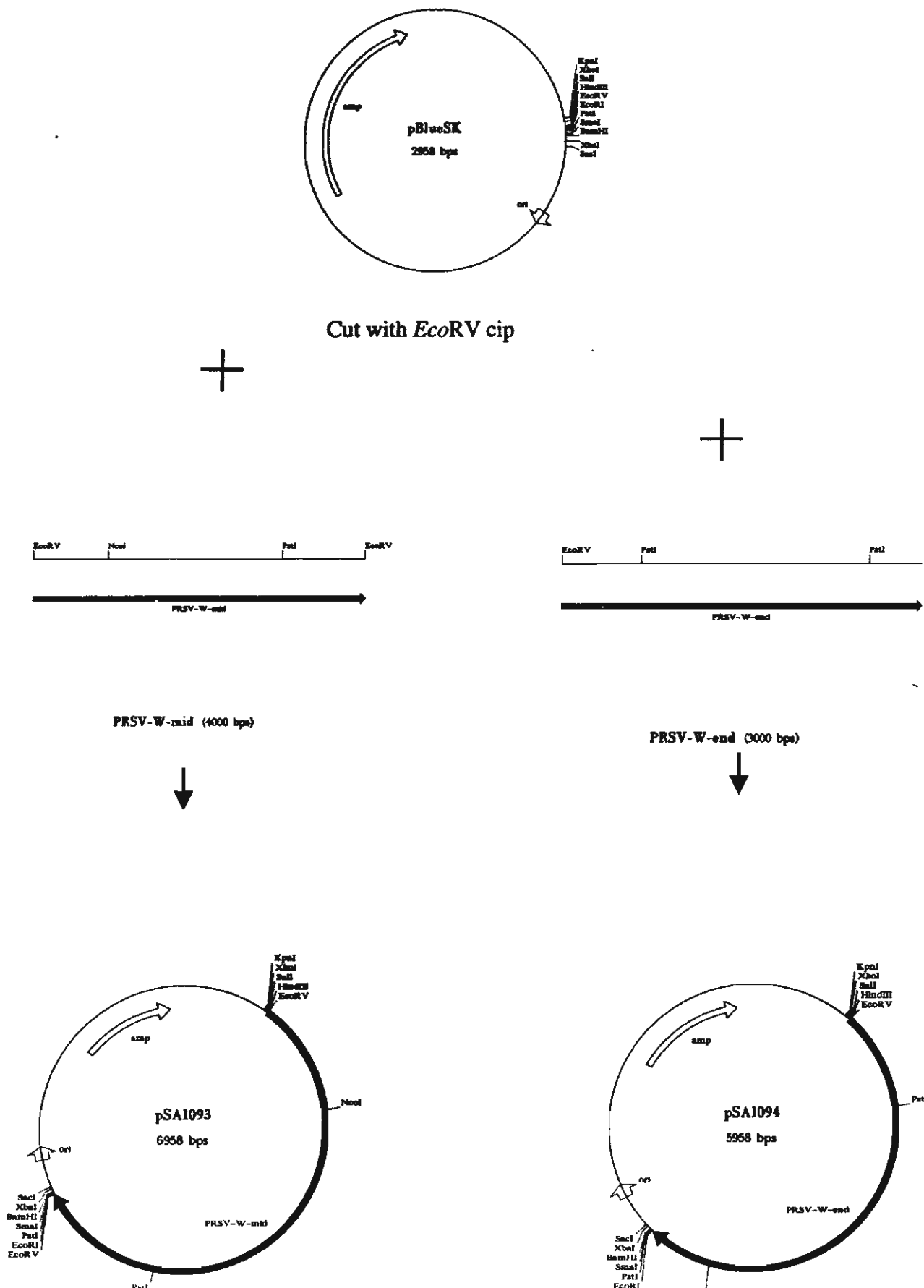


Fig. 31. Restriction analysis of pSA1093

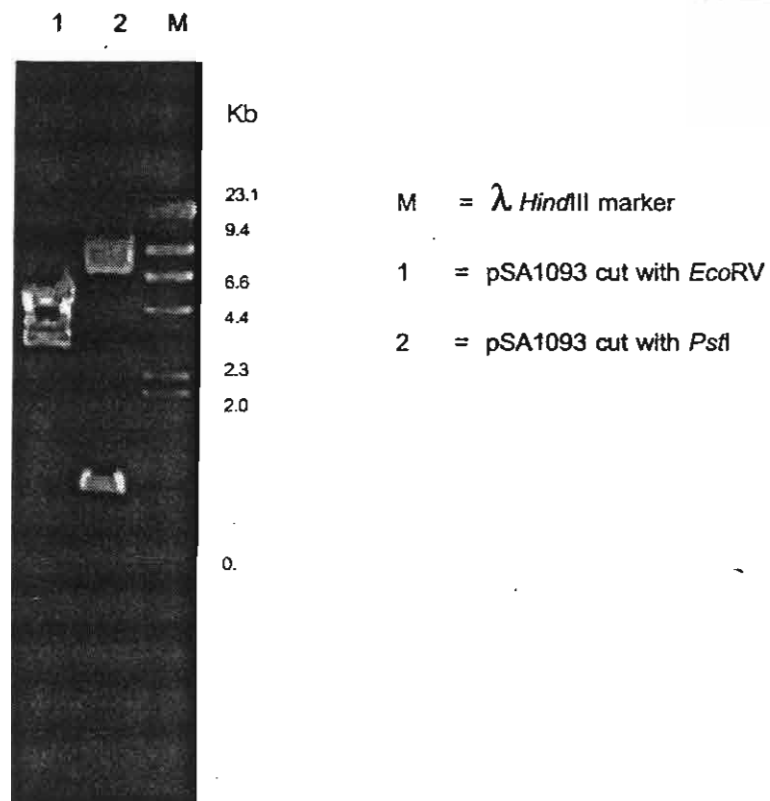
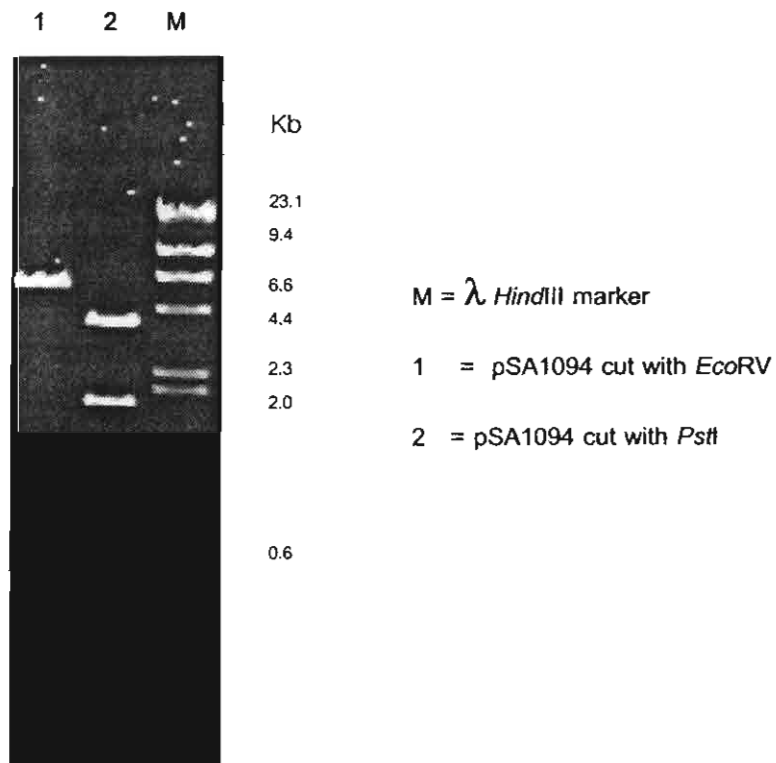


Fig. 32. Restriction analysis of pSA1094



9. ศึกษาวิธีการเตรียม protoplast จากใบมะละกอ

จากการทดลองใช้ buffer ที่มีความเข้มข้นของ mannitol และ enzymes ต่าง ๆ กัน พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียม protoplast คือ

1. ใช้ buffer ที่มีความเข้มข้น 0.7 M mannitol
2. ใช้ enzyme ที่ประกอบด้วย 1% cellulase และ 0.4% macerozyme

10. ศึกษาวิธีการนำ RNA ของ PRSV เข้าสู่ protoplast ที่เตรียมจากใบมะละกอโดยใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation)

ผลการทดลองพบว่าไม่สามารถตรวจพบ RNA ของ PRSV ใน protoplast ของมะละกอหลังจาก electroporation 24 ชั่วโมง ทั้งโดยวิธี dot blot และ northern Blot hybridization ทั้งนี้อาจเกิดจากสาเหตุ 2 ประการ คือ

1. RNA ของ PRSV ถูกย่อยโดย RNase จากเซลล์ในขณะทำ electroporation
2. RNA ของ PRSV สามารถเข้าสู่ protoplast โดยใช้วิธี electroporation แต่ RNA ไม่สามารถแบ่งตัวได้เนื่องจากโปรตีน VPg ซึ่งเป็นโปรตีนที่ติดอยู่ที่ปลาย 5' ของ RNA และอาจมีความเกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ RNA ของ PRSV ถูกทำให้เสียสภาพไปในระหว่างทำการสกัด RNA จากอนุภาค ไวรัส

ดังนั้นในการทดลองนี้จึงต้องมีการเปลี่ยนแปลงวิธีการที่ใช้ โดยหาวิธีการสกัด RNA ที่ไม่ทำลาย VPg และหาวิธีป้องกันการย่อย RNA ในระหว่างการทำ electroporation

บทวิจารณ์

การสร้าง infectious transcripts ของ RNA viruses เพื่อใช้ในการศึกษาสามารถทำได้โดยการสร้าง cDNA clones จาก RNA ของไวรัส (Boyer and Haenni 1999) แล้วนำแต่ละ clone ที่ได้มาต่อกัน ซึ่งเป็นวิธีที่ค่อนข้างยุ่งยากและใช้เวลานาน ในงานวิจัยนี้เราได้เสนอที่จะใช้วิธี PCR amplification ในการเพิ่มจำนวน full length cDNA ของไวรัสใบด่างจุดวงแหวนในมะละกอ (PRSV) ที่พบระบาดในประเทศไทย แล้วใช้ full length cDNA ในการสร้าง infectious transcripts ทั้งนี้เนื่องจากมีรายงานว่าสามารถใช้เทคนิคทาง PCR amplification เช่น long-accurate PCR (LA PCR) ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยที่มีขนาดใหญได้ถึง 42 kb ในการใช้วิธี PCR amplification ในการเพิ่มจำนวน full length cDNA ของไวรัสนั้นมีความจำเป็นที่จะต้องรู้ลำดับเบสที่ถูกต้องและแน่นอนของปลายสุดด้าน 5' และ 3' ของไวรัส PRSV ที่พบระบาดในประเทศไทย เพื่อออกแบบ primers ในการทำ PCR แต่ในปัจจุบันฐานข้อมูล GenBank มีรายงานลำดับจีโนมของ PRSV เพียง 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ Hawaii และ Taiwan ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่เราจะต้องใช้ข้อมูลที่มีอยู่ในการออกแบบ primers ให้ได้ถูกต้อง ที่ผ่านมามีการเพิ่มจำนวนฮีนเปลือกไวรัส (CP gene) ของ PRSV สายพันธุ์รุนแรงที่พบในประเทศไทยและได้เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ CP gene กับข้อมูลในฐานข้อมูลพบว่า CP gene ของ PRSV สายพันธุ์ไทยมีความคล้ายคลึงกับสายพันธุ์ Taiwan มากกว่าสายพันธุ์ Hawaii (Kertbundit et al., 1998) ดังนั้นจึงได้ใช้ส่วนของลำดับเบสที่อนุรักษ์ของสายพันธุ์ Hawaii และ Taiwan ในการออกแบบ primers เพื่อใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR amplification โดยใช้ข้อมูลของสายพันธุ์ Taiwan เป็นเกณฑ์ พบว่า primers ที่ได้ออกแบบในงานวิจัยนี้สามารถใช้เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอทางด้านปลาย 5' และ 3' ของไวรัส PRSV สายพันธุ์ไทยได้ทั้ง PRSV type P และ type W ฮีนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดย primers นี้ได้นำมาศึกษาลำดับเบสและใช้เป็นข้อมูลในการออกแบบ primers ชุดที่ 2 เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอส่วนปลายสุดของด้าน 5' และ 3' โดยใช้วิธี RACE-PCR และได้ศึกษาลำดับเบสของดีเอ็นเอนี้ เพื่อใช้ในการออกแบบ primers ส่วนปลายสุดของปลายด้าน 5' และ 3' ซึ่งเป็นส่วนที่สำคัญที่สุดเพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวน full length cDNA amplification ของ PRSV

การออกแบบ primer ทางปลายสุดของด้าน 5' นั้นได้ออกแบบให้มี T7 promoter ต่อทางด้านปลาย เพื่อใช้ promoter นี้ในการสร้าง infectious transcripts เนื่องจากมีรายงานว่า promoter นี้มีประสิทธิภาพดีกว่า SP6 หรือ T3 promoters (Boyer and Haenni 1999) เราได้เพิ่มเบส guanosine (G) จำนวน 1 เบสที่ปลายด้าน 5' หน้าเบส adenosine (A) ซึ่งเป็นเบสตั้งต้นของ PRSV genome เนื่องจากมีงานวิจัยหลายชิ้นรายงานว่า การเพิ่มเบส guanosine ช่วยเพิ่ม infectivity ของ infectious transcripts และ T7 polymerase มักใช้เบส guanosine ในการเริ่มปฏิกิริยา transcription (Domier et al 1998, Dolja et al 1992, Gal-On et al 1991)

งานวิจัยนี้ได้ทดลองใช้ 2 เทคนิคในการเพิ่มจำนวน full length cDNA โดยวิธี PCR เทคนิคแรกคือ megaprimer ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการทำ mutagenesis แต่ในระยะหลังได้มีการนำมาปรับปรุงใช้ในการ clone ไวรัส พืชด้วย เราพบว่าเมื่อใช้ primers ด้านปลาย 5' ที่มีขนาด 760 เบส และด้านปลาย 3' ที่มีขนาด 1 kb สามารถเพิ่มจำนวน full length cDNA ได้ เหตุผลในการใช้เทคนิคนี้คือลำดับเบสด้านปลาย 5' มีเบส A-T สูง หากใช้ primers ทั่วไปจะต้องใช้ oligonucleotide primers ที่ยาวมากในการทำ PCR amplification อย่างไรก็ตามเราพบว่าเทคนิคนี้ได้ปริมาณดีเอ็นเอน้อยและต้องใช้ปริมาณเอนไซม์ Expand Taq polymerase มากกว่าที่ระบุไว้ถึงสองเท่า จึงไม่ใช่วิธีที่เหมาะสมในการใช้เพิ่มปริมาณ full length cDNA เพื่อทำ cloning ดังนั้นจึงได้ทดลองใช้เทคนิคของ long accurate PCR (LA PCR) โดยการออกแบบ primers ที่ยาวและทดลองลดอุณหภูมิ extension

temperature เป็น 65 °C หรือ 68°C ตามที่เคยมีรายงาน (Su et al 1996) และได้ทดลองใช้เฉพาะ oligo dT primers ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา reverse transcriptase เนื่องจากพบว่าการใช้ primers ที่จำเพาะในขั้นตอนนี้ จะยับยั้งการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในขั้นตอน PCR ต่อไป

ขั้นตอนการตัดต่อ full length cDNA ของ PRSV เข้าพลาสมิดพาหะเป็นขั้นตอนที่ยากที่สุดในงานวิจัยทั้งหมด เราได้ทำการทดลอง cloning ด้วยวิธีต่างๆหลายวิธีแต่ไม่สามารถได้ clone ที่มี full length cDNA ของ PRSV ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานการทดลองที่พบว่า full length cDNA ของไวรัสพืชบางชนิดไม่สามารถ clone เข้าไปในพลาสมิดพาหะของแบคทีเรียได้ (Fakhfakh et al 1996) สาเหตุหนึ่งอาจเกิดจากปัญหาในการ clone ชิ้นดีเอ็นเอซึ่งได้จากการทำปฏิกิริยา PCR ซึ่งเป็นปัญหาที่มักพบในการทำ cloning สาเหตุอื่นอาจเกิดจากการที่มี cryptic promoters ในลำดับเบสของไวรัสซึ่งทำให้เกิดการสร้างสารที่เป็นพิษต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเจ้าบ้าน หรืออาจเกิดจากการสร้างสารที่เป็นพิษดังกล่าวภายใต้การควบคุมของ lacZ promoter ซึ่งอยู่ในพลาสมิดที่ใช้ในการ clone ซึ่งจากการสังเกตต่อมาพบว่าในการทดลองนี้แบคทีเรียเจ้าบ้านที่ได้รับพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอของ PRSV อยู่มักจะเติบโตช้าและมีขนาดเล็กกว่าปกติ

จากปัญหาในการ clone ชิ้น full length cDNA ของ PRSV จึงต้องเปลี่ยนวิธีการทดลอง โดยทำการศึกษาแผนที่จุดตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะบน full length cDNA (restriction enzyme mapping) แล้วใช้เอนไซม์ที่เหมาะสมตัด full length cDNA ของ PRSV เป็นชิ้นย่อย 3 ชิ้น แล้ว clone ชิ้นย่อยแต่ละชิ้นเข้าพลาสมิดพาหะ แล้วจึงนำมาต่อกันเป็น full length cDNA วิธีการนี้ใช้ clone ดีเอ็นเอชิ้นย่อยได้ใน PRSV type W แต่ไม่ได้ผลใน PRSV type P ทั้งนี้ได้เคยมีการตั้งข้อสงสัยแล้วว่า การ clone และการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของ PRSV type P โดยวิธี PCR ทำได้ยาก (Gonsalves, D. และ Dale, J. personal communication) ในขณะที่ของ PRSV type W สามารถทำได้ (Burns, T. personal communication) เราจึงได้ออกแบบ overlapping primers ชุดใหม่สำหรับ PRSV type P เพื่อใช้ในเทคนิค PCR amplification ซึ่งพบว่าสามารถใช้เพิ่มจำนวนชิ้นย่อยของ cDNA ได้จำนวนมาก

เพื่อแก้ปัญหาที่อาจเกิดจากการสร้างสารที่เป็นพิษต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียภายใต้การควบคุมของ lacZ promoter จึงได้ตัดส่วนของ promoter นี้ออกจากพลาสมิดพาหะและเปลี่ยนมาใช้แบคทีเรียเจ้าบ้าน JM109 แทน DH5 α พบว่าวิธีนี้สามารถใช้ clone ดีเอ็นเอชิ้นย่อยของ PRSV type P ได้

จากการตรวจสอบ clones ที่ได้ด้วยวิธีศึกษาลำดับเบสพบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีความเหมือน 100% กับลำดับเบสที่ได้จากการศึกษา PRSV สายพันธุ์ไทยที่เราได้ศึกษามา และมีความเหมือนกับสายพันธุ์ Taiwan 92% แสดงให้เห็นว่าไม่มีการผ่าเหล่าเกิดขึ้นในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธี PCR เนื่องจากเอนไซม์ Expand Taq polymerase ที่ใช้มีความถูกต้องแม่นยำสูงกว่าเอนไซม์ Amplitaq

ในส่วนปลายด้าน 3' ของ full length cDNA เราได้เติม polyA tail ขนาดประมาณ 100 เบสทางปลายสุดด้าน 3' ของ full length cDNA โดยใช้เอนไซม์ polynucleotide transferase เนื่องจากมีรายงานว่า long polyA tail มีความสำคัญต่อการก่อโรคของ infectious transcript โดยทำให้ RNA transcript มีความเสถียร (stability) มากขึ้น (Jackson and Standart 1990) ในธรรมชาติ PRSV สายพันธุ์ไทยมี polyA tail ยาวประมาณ 22 เบส ซึ่งอาจไม่พอในการทำให้ RNA transcript สามารถก่อโรคได้

การสร้าง infectious transcripts ที่มี full length cDNA ของ PRSV ในการทดลองนี้นับเป็นก้าวสำคัญในการศึกษาการทำงานของยีนของ PRSV ในระดับโมเลกุล เพื่อเข้าใจกลไกการก่อโรค การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนไวรัส การแพร่ไวรัสโดยการนำด้วยพาหะ นอกจากนั้น full length cDNA clone ยังสามารถเก็บไว้ได้นานเพื่อใช้ศึกษาเปรียบเทียบโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในยีนไวรัสในการทดลองสร้าง infectious transcript ของ papaya ringspot virus เพื่อใช้ในการศึกษาอื่นที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของไวรัสในระดับโมเลกุล

Output ที่ได้

Kertbundit, S., Attasart, P., Panyim, S. and Mila Juricek (1998) Nucleotide sequence and comparison of coat protein of papaya ringspot virus isolates from Thailand. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* , 1998, 6 (2) : 191-197

หนังสืออ้างอิง

- Ahlquist, P. and Janda, M. (1984) cDNA cloning and *in vitro* transcription of the complete brome mosaic virus genome. *Mol.Cell Biol.* 4, 2876-2882
- Aiyar, A. and Leis, J. (1993) Modification of the megaprimer method of PCR mutagenesis: improved amplification of the final product, *BioTechniques*, 14, 366-369.
- Barik, S. (1997) Mutagenesis and gene fusion by megaprimer PCR, *Methods Mol.Biol.*, 67:173-82, 173-182.
- Barik, S. and Galinski, M.S. (1991) "Megaprimer" method of PCR: increased template concentration improves yield, *BioTechniques*, 10, 489-490.
- Barnes, W.M. (1994) PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 91, 2216-2220.
- Boyer, J.C., Haenni, A. Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *VIROLOGY* 198, 415-426. 1999.
- Chattopadhyay, D. and Raha, T. (1997) PCR mutagenesis: treatment of the megaprimer with mung bean nuclease improves yield, *BioTechniques*, 22, 1054-1056.
- Contreras, R., Cheroute, H., Degraeve, W. and Fiers, F. (1982) Simple, efficient *in vitro* synthesis of capped RNA useful for direct expression of cloned eucaryotic genes. *Nucleic Acids research.* 10, 6353
- Dolja, V.V., McBride, H.J., Carrington, J.C., 1992. Tagging of plant potyvirus replication and movement by insertion of beta-glucuronidase into the viral polyprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 10208-10212.
- Domier, L.L., Franklin, K.M., Hunt, A.G., Rhoads, R.E., Shaw, J.G. (1998) Infectious *in vitro* transcripts from cloned cDNA of a potyvirus, tobacco vein mottling virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 3509-3513.
- Dzianott, A. M. and Bujarski, J.J. (1988) An *in vitro* transcription vector which generates nearly correctly ended RNAs by self-cleavage of longer transcripts. *Nucleic Acids Research.* 16, 10940
- Dzianott, A. M. and Bujarski, J.J. (1989) Derivation of an infectious viral RNA by autolytic cleavage of *in vitro* transcribed viral cDNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 4823-4827.