รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศสายพันธุ์ไทยและการใช้ในการตรวจหาไวรัสดังกล่าวในพืชและแมลง

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

อิมมูโนวิทยา และ การเกษตรด้านโรคพืช ที่เกี่ยวข้องกับ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้มุ่งเน้นผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศสายพันธุ์ไทย โดยการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์ *E. coli* และพัฒนาวิธีตรวจหาไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ ในพืชและแมลง โดยวิธีการทางอิมมูโนวิทยาที่มีประสิทธิภาพ

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

มะเขือเทศเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและอุตสาหกรรมของประเทศไทย นิยมปลูกเพื่อรับประทานผลสด นำมาประกอบเป็นอาหารและสำหรับส่งโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูป อย่างไรก็ตามมะเขือเทศเป็นพืชที่ถูกโรคและแมลงเข้าทำลายได้ง่าย ซึ่งทำให้ผลผลิตของมะเขือเทศลดลง โรคใบหงิกเหลืองที่เกิดจากไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ ถือเป็นโรคที่ทำให้เกิดความเสียหายอย่างมากให้กับการเพาะปลูกมะเขือเทศ โรคนี้พบระบาดทั่วไปในประเทศแถบเมดิเตอร์เรเนียน ตะวันออกกลาง แถบร้อนชื้นของแอฟริกา (Nakhla and Maxwell, 1998) รวมทั้งประเทศไทย (Thongrit *et.al.*, 1986)

ไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ (*Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV)) จัดเป็นพวกเจมินีไวรัส (Geminivirus) อยู่ในวงศ์ *Geminiviridae* สกุล *Begomovirus* มีอนุภาครูปทรงกลม เป็นแบบคู่ (Twin particle) โรคนี้สามารถถ่ายทอดได้โดยวิธีการทาบกิ่ง หรือโดยแมลงหวี่ขาว (*Besmisia tabaci*) มะเขือเทศที่เป็นโรคนี้จะแสดงอาการคือ ใบอ่อนที่แตกใหม่มีขนาดเล็ก หงิกงอ ขอบใบม้วน ผิวใบไม่เรียบ และมีสีเหลือง ต้นชะงักการเจริญเติบโต ดอกร่วง เมล็ดลีบถ้าเชื้อเข้าทำลายตั้งแต่ระยะอ่อน พืชจะแสดงอาการรุนแรง ต้นแคระแกร็น และไม่ติดผล (ธีระ, 2532) ในประเทศไทยจะพบการเข้าทำลายของโรคนี้ในมะเขือเทศในทุกๆ แหล่งปลูกที่สำคัญ ทั้งภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และ ภาคเหนือ เป็นต้น

ในการควบคุมโรคให้ได้ผลดีและเสียค่าใช้จ่ายน้อยที่สุด จำเป็นต้องทราบแน่ชัดก่อนว่าพืชเป็นโรคอะไร สาเหตุเกิดจากอะไร เพื่อที่จะได้เลือกวิธีการควบคุมโรคให้เหมาะสม ดังนั้นการตรวจสอบไวรัสทั้งในแมลงพาหะ

และในต้นพืชที่เป็นโรคไวรัสนับเป็นสิ่งที่จำเป็นมากในการศึกษาด้านระบาดวิทยาของโรคและการจัดการควบคุมโรค นอกจากนั้นการตรวจหาที่มีประสิทธิภาพยังมีความสำคัญมากในการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานต่อไวรัส ปัจจุบันมีหลายวิธีที่ใช้ในการตรวจหาโรคไวรัสของพืช ได้แก่ วิธีการทางอิมมูโนวิทยา (immunological detection), วิธีนิวคลีอิก แอซิด ไฮบริไดเซชั่น เอสเส (nucleic acid hybridization assay) และวิธีพีซีอาร์ (PCR หรือ polymerase chain reaction) (Czosnek *et.al*., 1988; Martin, 1998; Navot *et.al*. 1992) โดยแต่ละวิธีจะมีข้อเด่นและข้อด้อยแตกต่างกันไป การตรวจสอบโรคไวรัสของพืชให้ถูกต้องแม่นยำ อาจต้องใช้วิธีตรวจสอบหลายวิธีร่วมกัน (Pico *et.al*., 1999)

วิธีพีซีอาร์ จะมีความไวสูง สามารถตรวจสอบได้แม้มีปริมาณไวรัสต่ำ แต่เป็นวิธีที่มีราคาแพง อาจเกิดผลบวกลวง (false positive) หรือผลลบลวง (false negative) ได้ง่าย การทำพีซีอาร์ ต้องผ่านขั้นตอนหลายขั้นตอน ตั้งแต่ขั้นตอนการสกัดดีเอนเอ (DNA) การเพิ่มปริมาณดีเอนเอเป้าหมายด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งต้องอาศัยเครื่องพีซีอาร์ ต้องมีการวิเคราะห์ดีเอนเอด้วยวิธีการแยกแถบดีเอนเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นเจลอะกาโรส ทุกขั้นตอนต้องทำในห้องปฏิบัติการโดยผู้มีประสบการณ์

วิธีนิวคลีอิก แอซิด ไฮบริไดเซชั่น เอสเสเป็นวิธีที่มีความไวสูงเช่นกัน แต่เป็นวิธีที่มีราคาแพงและใช้เวลานาน ทุกขั้นตอนต้องทำในห้องปฏิบัติการโดยผู้มีประสบการณ์

สำหรับวิธีการตรวจหาไวรัสของพืชโดยวิธีทางอิมมูโนวิทยาโดยอาศัยการจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากสำหรับการตรวจหาไวรัสของพืชโดยเฉพาะวิธีอิไลซ่า ที่สามารถตรวจสอบตัวอย่างได้คราวละมากๆ ง่าย ราคาถูก ทำได้รวดเร็ว (Halk, 1985) ถ้ามีแอนติบอดีที่ดีก็จะสามารถพัฒนาเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง อย่างไรก็ตามโรคที่เกิดจากเจมินีไวรัสที่ถูกถ่ายทอดโดยแมลงหวี่ขาวมีข้อจำกัดในการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อไวรัสนี้ เนื่องมาจากการเตรียมอนุภาคไวรัสให้บริสุทธิ์นั้นทำได้ยาก ทั้งยังได้ปริมาณน้อยไม่เพียงพอสำหรับการนำมาใช้เป็นแอนติเจนเพื่อผลิตแอนติบอดี

จากการศึกษาที่มีมาก่อนพบปัญหาว่าการใช้ไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ฉีดกระต่ายเพื่อผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี นอกจากจะได้แอนติบอดีที่มีไตเตอร์ค่อนข้างต่ำแล้ว แอนติบอดีเหล่านี้ยังสามารถทำปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะเจาะจงกับโปรตีนของพืชอีกด้วย ซึ่งเมื่อนำมาใช้ในการตรวจหาไวรัสในพืชที่เป็นโรค จะทำให้เกิดสีเบื้องหลังสูงไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างปฏิกิริยาที่เกิดจากต้นพืชปกติและต้นพืชที่เป็นโรคได้อย่างชัดเจน การใช้เทคนิคทางโมโนโคลนอลแอนติบอดีจึงได้เข้ามามีบทบาท เพราะสามารถผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อส่วนเฉพาะ (epitope) ที่ต้องการ ทั้งยังได้แอนติบอดีที่มีคุณภาพคงที่ มีมาตรฐานเดียวกันตลอด และสามารถผลิตได้โดยไม่มีขีดจำกัด

ได้มีรายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัสในกลุ่มเจมินีไวรัสที่ถูกถ่ายทอดโดยแมลงหวี่ขาว (บีโกโมไวรัส) เช่น โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตต่อไวรัสบริสุทธิ์ของไวรัสแอฟริกัน คาซาว่า โมซาอิก (*African cassava mosaic virus*) โดย Thomas *et.al* (1986) ซึ่งจากการศึกษาครั้งนั้นสามารถผลิตโมโนโคลนอล

แอนติบอดีได้หลากหลายและยังมีคุณสมบัติต่างๆ กันอีกด้วย โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีบางตัวสามารถทำปฏิกิริยากับส่วนคอนเสริฟ อิปิโทป (conserved epitopes) ของไวรัสในกลุ่มที่ถูกถ่ายทอดโดยแมลงหวี่ขาว โมโนโคลนอลแอนติบอดีบางตัวสามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะเจาะจงต่ออิปิโทปที่เฉพาะสำหรับไวรัสบางชนิดเท่านั้น สำหรับในต่างประเทศมีหลายบริษัทที่ผลิตแอนติบอดี และชุดตรวจสอบเจมินีไวรัส และไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ อย่างไรก็ตามแอนติบอดี และชุดตรวจสอบเหล่านี้ไม่ได้ผลิตต่อไวรัสสายพันธุ์ที่มาจากประเทศไทย จึงอาจจะไม่สามารถใช้ตรวจสอบกับสายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศไทยได้ และในประเทศไทยเองยังไม่มีรายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเจมินีไวรัสมาก่อน ทั้งที่แอนติบอดี และวิธีการตรวจหาที่มีประสิทธิภาพเป็นที่ต้องการอย่างมากของทั้งหน่วยงานราชการและบริษัทจำหน่ายเมล็ดพันธุ์ ทั้งนี้เพื่อใช้ในการจำแนกว่าต้นพืชที่เป็นโรคที่พบในแปลงปลูกเกิดจากเชื้อไวรัสชนิดนี้หรือไม่ ซึ่งจะมีประโยชน์ในการจัดการควบคุมโรคได้ถูกต้องต่อไป นอกจากนี้ยังเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้ตรวจสอบเพื่อคัดเลือกพันธุ์ต้านทานต่อไวรัสชนิดนี้ และใช้ในงานวิจัยด้านอื่นๆ อีกด้วย

ดังนั้นการประดิษฐ์นี้จึงมุ่งเน้นเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศสายพันธุ์ไทย โดยที่การประดิษฐ์นี้จะเพิ่มขั้นการประดิษฐ์ที่สูงขึ้นจากการเริ่มต้นคัดเลือกโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศที่จะใช้เป็นแอนติเจนที่ดีก่อนนำมาผลิตด้วยระบบการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์ *E. coli* เพื่อแก้ปัญหาที่เกิดจากข้อจำกัดของการเตรียมไวรัสให้บริสุทธิ์จากต้นมะเขือเทศที่เป็นโรค ดังนั้นผลผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จะมีศักยภาพสูงสุดในการตรวจสอบ การประดิษฐ์นี้ได้ใช้แอนติบอดีที่ผลิตได้มาพัฒนาวิธีตรวจหาไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศในต้นพืชและแมลง โดยวิธีการทางอิมมูโนวิทยาที่มีประสิทธิภาพ

คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ

รูปที่ 1 แสดงการแสดงออกของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ เมื่อชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน และตรวจการแยกขนาดโปรตีนโดยใช้ 12% SDS-PAGE และย้อมด้วย Coomassie Brilliant BlueR-250

รูปที่ 2 แสดงการตรวจโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอท โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อบีโกโมไวรัส

รูปที่ 3 แสดงการตรวจสอบไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศและบีโกโมไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ชนิดต่างๆ โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน M1 ตรวจด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอท

รูปที่ 4 แสดงการตรวจสอบไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศและบีโกโมไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ชนิดต่างๆ โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน M1 ตรวจด้วยวิธี ด๊อทบลอท

รูปที่ 5 แสดงการตรวจสอบไวรัสในน้ำคั้นใบพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศและบีโกโมไวรัสชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับน้ำคั้นใบพืชปกติโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน M1 ตรวจด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอท

รูปที่ 6 แสดงการตรวจสอบไวรัสในน้ำคั้นใบพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศและบีโกโมไวรัสชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับน้ำคั้นใบพืชปกติโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน M1 ตรวจด้วยวิธีด๊อทบลอท

รูปที่ 7 แสดงการตรวจสอบไวรัสในน้ำคั้นใบมะเขือเทศและพริกที่ติดเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ (■) และน้ำคั้นใบฟัก แตงกวา บวบ และกระเจี๊ยบที่ติดเชื้อบีโกโมไวรัส (■) เปรียบเทียบกับน้ำคั้นใบพืชปกติ (□) โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน M1 ตรวจด้วยวิธี เพลทแทรป แอนติเจน อิไลซ่า

รูปที่ 8 แสดงการตรวจสอบไวรัสในน้ำคั้นใบมะเขือเทศและพริกที่ติดเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ (■) และน้ำคั้นใบฟัก แตงกวา บวบ และกระเจี๊ยบที่ติดเชื้อบีโกโมไวรัส (■) เปรียบเทียบกับน้ำคั้นใบพืชปกติ (□) โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีของกระต่ายที่สร้างต่อเชื้อบีโกโมไวรัส ร่วมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน M1 ตรวจด้วยวิธี แซนวิช อิไลซ่า

รูปที่ 9 แสดงการตรวจไวรัสในแมลงหวี่ขาวที่มีเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศที่ได้จากการให้แมลงดูดกินต้นมะเขือเทศที่ติดเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศเปรียบเทียบกับแมลงหวี่ขาวปกติที่ได้จากการให้แมลงดูดกินต้นมะเขือเทศปกติโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน M1 ตรวจด้วยวิธี เวสเทิร์นบลอท

เอกสารอ้างอิง

ธีระ สูตะบุตร 2532 ไวรัสใบหงิกมะเขือเทศ (Tomoto Yellow Leaf Curl Virus) ในโรคไวรัสและโรคคล้ายไวรัสของพืชสำคัญในประเทศไทย, 125-127.

Attathom, S., Cheimsombat, P., Kositratana, W. and Sae-Ung, N. 1994 Complete nucleotide sequence and genome analysis of bipartite Tomato Yellow Leaf Curl Virus in Thailand. Kasetsart J. 28, 632-639.

Bradford, M.M. 1976 A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Analy Biochem 72, 248-254.

Chiemsombat, P., Kositratana, W., Attathom, S., Sutabutra, T. and Sae-aung, N. 1990 DNA probe and nucleic acid hybridization for plant virus detection. Kasetsart J. 24, 12-16.

Czosnek, H., Ber, R., Navot, N. and Zamir, D. 1988 Detection of Tomato Yellow Leaf Curl Virus in lysates of plants and insects by hybridization with a viral DNA probe. Plant Disease 72, 949-951.

Halk, E. L. 1985 Monoclonal antibodies in plant-disease research. Ann. Rev. Phytopathol. 23, 321-350.

Kohler, G. and Milstein, C. 1975 Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256, 495-497.

Macintosh, S., Robinson, D.J, and Harrison, B.D. 1992 Detection of three whitefly-transmitted geminiviruses occuring in Europe by tests with heterologous monoclonal antibodies. Ann. Appl. Biol. 121 297-303.

Martin, R.R. 1998 Advance diagnostic tools as an aid to controlling plant virus diseases. In Plant Virus Disease Control. edited by Hadidi A, Khetarpal RK and Koganezawa H, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, p 381-398.

Nakhla, M.K. and Maxwell, D.P. 1998 Epidemology and management of tomato yellow leaf curl disease. In Plant Virus Disease Control edited by Hadidi A, Khetarpal RK and Koganezawa H, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, p 565-583.

Navot, N., Zeidan, M., Pichersky, E., Zamir, D. and Czosnek, H. 1992 Use of the polymerase chain reaction to amplify tomato yellow leaf curl virus DNA from infected plants and viruliferous whiteflies. Phytopathology 82, 1199-1202.

Pico, B., Diez, M.J. and Nuez, F. 1999 Improved diagnostic techniques for tomato yellow leaf curl virus in tomato breeding programs. Plant Disease 83, 1006-1012.

Thongrit, D. , Attathom, S. and Sutabutra, T. 1986 Tomoto Yellow Leaf Curl Disease in Thailand Food and Fertilizer Technology Center for the Asian and Pacific Region. Bulletin no.33. pp.61- 63.

Thomas, J.E., Massalski, P.R. and Harrison, B.D. 1986 Production of monoclonal antibodies to African Cassava Mosaic Virus and differences in their reactivities with other whitefly-transmitted geminiviruses. J. Gen. Virol. 67, 2739-2748.

การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

1) การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศสายพันธุ์ไทย ประกอบด้วยขั้นตอนดังต่อไปนี้

1.1 การเตรียมแอนติเจนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศโดยระบบการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์ *E. coli*

มีวิธีการเตรียมโดยสังเขปคือ สังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (CP) ของไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศจากพลาสมิด pTYLCA ซึ่งมียีนของไวรัส TYLCV component A สายพันธุ์ไทย (Attathom *et al.*, 1994 และ Chiemsombat *et al.*, 1990) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR หรือ Polymerase Chain Reaction) โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่เพื่อให้มีความจำเพาะต่อยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ มีลำดับเบส ดังนี้

ไพรเมอร์ CPA1 (CG GGA TCC ATG TCG AAG CGT CCA G) และ

ไพรเมอร์ CPA2 (CCC AAG CTT TTA ATT CGT CAC TGA G)

นำผลผลิตจากพีซีอาร์ (PCR product) ที่ได้ขนาดประมาณ 770 คู่เบส มาโคลนเข้ากับเอ็กส์เพรสชั่นเวคเตอร์ (expression vector) pQE 30 ในตำแหน่งเอนไซม์ *Bam*HI และ *Hin*dIII ทำให้ได้พลาสมิด pQE 30-CPA แล้วถ่าย (transform) พลาสมิดดังกล่าวเข้าไปในเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ M15 ซึ่งมีพลาสมิด pREP 4 เป็นพลาสมิดรีเพรสเซอร์ (repressor plasmid) อยู่ด้วย คัดเลือกเซลล์ *E. coli* ทรานฟอร์มแม้นท์ (transformants) ที่มียีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณและชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศด้วยสารไอโซโพรพิล-1-ไธโอ-บี-ดี กาแลคโตไซด์ (isopropyl-1-thio-B-D galactoside (IPTG)) เป็นเวลาอย่างน้อย 5 ชั่วโมง จากนั้นทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยการผ่านคอลัมน์ภายใต้สภาพดีเนเซอริ่ง (denaturing condition) วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธีแบรดฟอร์ด (Bradford method) (Bradford, 1976)

<u>ผลการทดลอง</u>

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศใน *E. coli* ที่มีพลาสมิด pQE 30-CPA เมื่อชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศด้วยสาร IPTG เป็นเวลา 5 ชั่วโมง พบว่าตรวจพบแถบโปรตีนเข้มที่มีขนาด 34 กิโลดาลตัน ในเซลล์ที่ถูกทำให้แตก (cell lysate) (รูปที่ 1 แถวที่ 3) ในขณะที่ไม่พบแถบโปรตีนนี้ในเซลล์ *E. coli* ที่ไม่ถูกชักนำ (รูปที่ 1 แถวที่ 2) เมื่อนำโปรตีนไปผ่านการทำบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ (Ni-NTA agarose resin column) ภายใต้สภาพดีเนเซอริ่ง (denaturing condition) พบว่าโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศจะติดอยู่กับคอลัมน์ โดยเมื่อล้างคอลัมน์จะพบแถบโปรตีนบางๆ อยู่ในส่วนน้ำล้าง (washing fraction) (รูปที่ 1 แถวที่ 4) ในขณะที่เมื่อทำการชะโปรตีนออกมาจากคอลัมน์จะพบแถบโปรตีนเข้มที่มีขนาด 34 กิโลดาลตัน ของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศอยู่ในส่วนชะคอลัมน์ (Eluted fraction) (E1-E4) (รูปที่ 1 แถวที่ 5-8) รูปที่ 1 แถวที่ 1 แสดงเครื่องหมายแสดงขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน และพบว่าแถบโปรตีนนี้ถูกจับด้วยโพลิโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างต่อเชื้อบีโกโมไวรัส เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอท ดังแสดงในรูปที่ 2 แถวที่ 2

1.2 การฉีดกระตุ้นหนูด้วยแอนติเจนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ

หนูเพศเมียสายพันธุ์ BALB/c อายุ 6 สัปดาห์ถูกฉีดกระตุ้นด้วยแอนติเจนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศที่ได้จากข้อ 1.1 ฉีดกระตุ้นทั้งหมด 8 ครั้ง โดยฉีดครั้งละ 100 ไมโครกรัมของแอนติเจน โดยวิธีฉีดเข้าช่องท้อง ซึ่งตารางการฉีดเป็นดังต่อไปนี้ ฉีดกระตุ้น 5 ครั้งแรก สัปดาห์เว้นสัปดาห์ติดต่อกัน หลังจากนั้นเว้นระยะการฉีดไป 6 เดือนแล้วจึงฉีดกระตุ้นหนูอีก 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกันประมาณ 1 สัปดาห์ ทุกครั้งหลังการฉีดกระตุ้นได้ 7 วันทำการเก็บเลือดจากปลายหางหนูมาตรวจสอบค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศโดยใช้เทคนิคเพลทแทรป แอนติเจน อิไลซ่า (plate-trapped antigen ELISA) เลือกหนูที่มีค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีสูงที่สุดมาใช้ในการเชื่อมเซลล์ โดยก่อนการเชื่อมเซลล์ 4 วันฉีดกระตุ้นหนูด้วยแอนติเจนเป็นครั้งสุดท้ายในปริมาณ 200 ไมโครกรัมเพื่อให้ค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีขึ้นสูง

1.3 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ

วิธีการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาทำได้โดยนำเซลล์ของม้ามจากหนูที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยแอนติเจนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ มาผสมกับเซลล์มัยอีโลมาซึ่งเป็นไปตามวิธีการมาตรฐานของเทคนิคการผลิตไฮบริโดมา (Kohler and Milstein, 1975) มีวิธีการโดยสังเขปคือ นำเซลล์ม้ามจากหนูที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ มาเชื่อมเข้ากับเซลล์มัยอีโลมาสายพันธุ์ P3X63.Ag 8.653 ในอัตราส่วนเซลล์ม้ามต่อเซลล์มัยอีโลมาประมาณ 5:1 โดยใช้สารละลายพีอีจี 50% (wt/vol) (polyethylene glycol (PEG, MW 4000)) จากนั้นทำการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่เกิดจากการเชื่อมระหว่างเซลล์ บี-ลิมโฟซัยท์และเซลล์มัยอีโลมาโดยเลี้ยงในอาหารแฮท (HAT medium) นำถาดเพาะเลี้ยงเซลล์บ่มในตู้ที่อุณหภูมิประมาณ 37 องศาเซลเซียส มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% มีความชื้นสัมพัทธ์ 90% หลังจากเชื่อมเซลล์ได้ 9-14 วัน เมื่อกลุ่มเซลล์ไฮบริโดมาเจริญได้ประมาณ 1/3 ของพื้นที่ก้นหลุม นำน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์มาตรวจหาแอนติบอดีต่อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ ด้วยวิธีเพลทแทรป แอนติเจน อิไลซ่า

1.4 การตรวจสอบเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ

ใช้เทคนิคเพลทแทรป แอนติเจน อิไลซ่า ซึ่งมีวิธีการโดยสังเขปคือ นำโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ ซึ่งเจือจางในสารละลายคาร์บอเนต (carbonate buffer) pH 9.6 มาเคลือบลงในหลุมของถาดอิไลซ่า โดยมีความเข้มข้นของโปรตีน 4 ไมโครกรัมต่อหลุม จากนั้นเติมสารละลายบล็อกกิ้ง (blocking solution) (2% BSA ใน PBS-Tween20) นำน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาเติมลงไปจากนั้นจึงเติมแอนติบอดีจากแพะต่ออิมมูโนโกลบูลินของหนู (goat anti-mouse immunoglobulin) ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase) โดยระหว่างแต่ละขั้นตอนที่กล่าวมาทำการล้างถาดทดลองด้วยสารละลายพีบีเอส-ทวีน 20 จากนั้นจึงเติมสารละลายสับสเตรทพีเอนพีพี (p-nitrophenyl phosphate disodium (PNPP)) ลงไป แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (3 N NaOH) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านผลอิไลซ่า

1.5 การโคลนเซลล์ไฮบริโดมาด้วยวิธีการเจือจาง (limiting dilution)

ขั้นตอนนี้เป็นการแยกเซลล์ไฮบริโดมาให้ได้เป็นเซลล์เดี่ยวๆ เพื่อให้เจริญเป็นกลุ่มเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีเพียงชนิดเดียวเท่านั้น (monoclonal antibody) ซึ่งทำได้โดย นำเซลล์ไฮบริโดมาจากหลุมที่ตรวจสอบแล้วว่าผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศมาเจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้เซลล์ไฮบริโดมา 0.5 และ 1 เซลล์ต่อหลุม จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยง เมื่อกลุ่มเซลล์ไฮบริโดมาเจริญได้ประมาณ 1/3 ของพื้นที่ก้นหลุมนำน้ำเลี้ยงเซลล์มาตรวจสอบแอนติบอดีต่อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ ทำการโคลนเซลล์ไฮบริโดมาซ้ำอีกสองรอบ เพื่อให้แน่ใจว่ากลุ่มเซลล์ที่ได้มาจากเซลล์เพียงหนึ่งเซลล์เท่านั้น

1.6 การทดสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ ด้วยวิธีดังนี้

1.6.1 การตรวจสอบชนิด (isotype) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

1.6.2 การตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัสชนิดต่างๆ ในกลุ่มเจมินีไวรัสที่ถูกถ่ายทอดโดยแมลงหวี่ขาว (บีโกโมไวรัส)

1.6.3 การทดสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ในการตรวจสอบบีโกโมไวรัสในน้ำคั้นพืช เปรียบเทียบระหว่างพืชที่เป็นโรค และพืชที่ไม่เป็นโรค ด้วยวิธีอิไลซ่า, วิธีเวสเทิร์นบลอท และวิธีด๊อทบลอท

<u>ผลการทดลอง</u>

จากการทดสอบคุณสมบัติได้คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา โคลน M1 ซึ่งผลิตแอนติบอดีชนิด IgG1, IgG2a, และ κ light chain เรียกว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี M1 ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่เป็นโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ รวมทั้งทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะเจาะจงกับไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศค่อนข้างบริสุทธิ์ (partially purified TYLCV) แต่ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับบีโกโมไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ (partially purified begomovirus) ชนิดอื่นๆ เช่น บีโกโมไวรัสที่เข้าทำลาย แตงกวา ตำลึง ฟักทอง ฟัก และ บวบ เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีเพลทแทรป แอนติเจน อิไลซ่า ที่แสดงผลในตารางที่ 1, วิธีเวสเทิร์นบลอท (รูปที่ 3), และวิธีด๊อทบลอท (รูปที่ 4)

รูปที่ 3 แสดงผลจากวิธีเวสเทิร์นบลอท แถวที่ 1 คือเครื่องหมายแสดงขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (Molecular weight marker) แถวที่ 2 คือโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ แถวที่ 3-4 คือไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศค่อนข้างค่อนข้างบริสุทธิ์ที่เตรียมจากมะเขือเทศ แถวที่ 4-8 คือบีโกโมไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ที่เตรียมจาก แตงกวา ตำลึง ฟักทอง ฟัก และ บวบ ตามลำดับ

รูปที่ 4 แสดงผลจากวิธีด๊อทบลอท แถวที่ 1 คือบีโกโมไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ที่เตรียมจาก บวบ แถวที่ 2 คือไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศค่อนข้างบริสุทธิ์ที่เตรียมจาก มะเขือเทศ แถวที่ 3-5 คือบีโกโมไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ที่เตรียมจาก ตำลึง ฟักทอง และ ฟัก ตามลำดับ

ตารางที่ 1

แอนติเจน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร
โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ	1.495
ไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศค่อนข้างค่อนข้างบริสุทธิ์ที่เตรียมจากมะเขือเทศ	1.800
บีโกโมไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ที่เตรียมจากแตงกวา	0.110
บีโกโมไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ที่เตรียมจากตำลึง	0.107
บีโกโมไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ที่เตรียมจากฟักทอง	0.081
บีโกโมไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ที่เตรียมจากฟัก	0.086
บีโกโมไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ที่เตรียมจากบวบ	0.101
บัพเฟอร์	0.106

1.7 การเพิ่มปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธีการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาใน Integra Celline flask

ทำการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ในขวดแฟลส์คขนาด 75 ตารางเซนติเมตร (Tissue culture flask) โดยใช้อาหารไฮบริโดมาซีรั่มฟรีมีเดียม (Hybridoma serum free medium, HSFM) เพื่อใช้เป็นเซลล์ตั้งต้นสำหรับการเพิ่มปริมาณ เมื่อเซลล์เจริญเติบโตอยู่ในช่วงล็อคเฟส (log phase) และมีอัตราการรอดชีวิตอยู่ที่ 80 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป นำเซลล์ไฮบริโดมาจำนวน $3x10^7$ เซลล์ ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปละลายในอาหารไฮบริโดมาซีรั่มฟรีมีเดียม (HSFM) ปริมาณ 15 มิลลิลิตร นำเซลล์ไฮบริโดมาแขวนลอยที่ได้ใส่ลงในชั้นถุงซิลิโคนเมมเบรนของอินเทก้าเซลล์ไลน์แฟลส์ค (Integra Celline flask) และเติมอาหารไฮบริโดมาซีรั่มฟรีมีเดียม (HSEM) ปริมาณ 250 มิลลิลิตร ลงในแฟลส์คส่วนด้านนอกของถุงซิลิโคน แล้วบ่มเซลล์ไฮบริโดมาในตู้ที่มีการควบคุมความชื้น ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ และอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บแอนติบอดีที่อยู่ในถุงซิลิโคนเมมเบรน โดยการเก็บแต่ละครั้งห่างกัน 1 สัปดาห์ และจะคงเหลือปริมาณเซลล์ไฮบริโดมาไว้อย่างน้อย $3x10^7$ เซลล์ ในถุงซิลิโคนเมมเบรน โดยเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ให้ครบ 15 มิลลิลิตร และทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ในส่วนด้านนอกของถุงซิลิโคนใหม่ทุกสัปดาห์เช่นกัน ในการเก็บแอนติบอดีแต่ละครั้งทำการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อกำจัดเซลล์และซากเซลล์ที่แขวนลอยอยู่ เก็บส่วนใสซึ่งเป็นส่วนที่มีโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นสูงที่ -20 องศาเซลเซียส

2) การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี

การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ ในการตรวจหาไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ

2.1 แหล่งที่มาของพืชเป็นโรค

เชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศที่รายงานโดย Attathom *et al.*, 1994 ได้รับการต่อเชื้อไว้ในต้นมะเขือเทศโดยวิธีการปลูกเชื้อ (graft inoculation) ส่วนเชื้อเจมินีไวรัสที่ถ่ายทอดโดยแมลงหวี่ขาวชนิดอื่นๆ ได้มาจากพืชเป็นโรคชนิดต่างๆ ที่ติดเชื้อนี้ ได้แก่ แตงกวา ฟักทอง ฟัก ตำลึง เก็บจากจังหวัดสุพรรณบุรี บวบเก็บจากจังหวัดขอนแก่น กระเจี๊ยบเก็บจากจังหวัดกรุงเทพ พืชเหล่านี้ได้รับการตรวจว่าติดเชื้อบีโกโมไวรัสด้วยวิธีนิวคลีอิค แอซิด โพรบ และ นิวคลีอิค แอซิด ไฮบริไดเซชั่น โดยใช้ ดีเอ็นเอ โพรบ จากคอมโพแนนท์ เอ (component A) ของเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ (Chiemsombat *et al.*, 1996) นอกจากนี้เชื้อบีโกโมไวรัสเหล่านี้ยังได้รับการพิสูจน์ว่าสามารถถ่ายทอดได้ด้วยแมลงหวี่ขาว (*Bemisia tabaci Genn.*) ในแบบไวรัสคงอยู่ในตัวแมลง (persistent manner) เชื้อบีโกโมไวรัสเหล่านี้ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (partially purified begomoviruses) โดยวิธีการที่มีรายงานมาแล้วของ Honda *et al.*, 1983

ทั้งน้ำคั้นใบพืชเป็นโรคและไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ที่เตรียมขึ้นเหล่านี้จะถูกนำไปใช้ในการทดสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการทดลองต่อไป

2.2 การเตรียมตัวอย่างน้ำคั้นพืช

บดใบพืชปริมาณ 0.16 กรัมของใบสด หรือ 0.01 กรัมของใบแห้งในสารบัฟเฟอร์สำหรับการสกัด (0.05 M Tris-HCl, 0.06 M sodium sulphite, pH 8.5, Macintosh *et. al.*, 1992) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำน้ำคั้นพืชที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีนาน 5 นาที เก็บน้ำใสเพื่อนำมาใช้ตรวจสอบไวรัสต่อไป

2.3 เทคนิคทางอิมมูโนวิทยา

ในการตรวจสอบไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้

2.3.1 การตรวจสอบโดยเทคนิคเวสเทิร์นบลอท

นำน้ำคั้นจากใบพืชมาแยกโปรตีนตามขนาดด้วยวิธีการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นเจล (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) จากนั้นเคลื่อนย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลสู่แผ่นไนโตรเซลลูโรส (nitrocellulose membrane) แล้วนำแผ่นไนโตรเซลลูโรสมาผ่านขั้นตอนการย้อมสีโปรตีน (immunostaining) โดยนำแผ่นไนโตรเซลลูโรสมาแช่ในสารละลาย TBST (10 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) จากนั้นจึงนำไปแช่ในสารละลายบล็อกกิ้ง (4% BSA ที่ละลายใน TBST) เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะเจาะจง แล้วจึงเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศที่ผลิตได้ ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโรส แล้วเติมแอนติบอดีจากแพะต่ออิมมูโนโกลบูลินของหนู ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส หลังจากล้างแผ่นไนโตรเซลลูโรส แล้วเติมสารละลายสับสเตรท NBT/BCIP ทิ้งไว้นาน 5-10 นาที จนเห็นแถบสี ล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อหยุดปฏิกิริยา

<u>ผลการทดลอง</u>

เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดี M1 มาตรวจสอบพืชที่ติดเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศและพืชที่ติดเชื้อเจมินีไวรัสที่ถ่ายทอดโดยแมลงหวี่ขาว (บีโกโมไวรัส) โดยเทคนิคเวสเทิร์นบลอท พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี M1 สามารถทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะเจาะจงกับไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศในน้ำคั้นของใบมะเขือเทศที่เป็นโรคนี้รวมทั้งทำปฏิกิริยากับโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศเท่านั้นโดยให้แถบโปรตีนขนาด 34 kDa แต่ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับบีโกโมไวรัสชนิดอื่นๆ ได้แก่ บีโกโมไวรัสในน้ำคั้นใบแตงกวาเป็นโรค, ฟักเป็นโรค และยาสูบเป็นโรคที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อบีโกโมไวรัสจากแตงกวาโดยแมลงหวี่ขาว รวมทั้งไม่ทำปฏิกิริยากับพืชปกติที่ไม่เป็นโรค ดังแสดงในรูปที่ 5 แถวที่ 1 น้ำคั้นใบพืชจากมะเขือเทศติดเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ แถวที่ 2 น้ำคั้นใบพืชจากมะเขือเทศปกติ แถวที่ 3 และ 4 น้ำคั้นใบพืชจากมะเขือเทศติดเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ แถวที่ 5 และ 6 น้ำคั้นใบพืชจากแตงกวาติดเชื้อบีโกโมไวรัส แถวที่ 7 น้ำคั้นใบพืชจากแตงกวาปกติ แถวที่ 8 น้ำคั้นใบพืชจากฟักปกติ แถวที่ 9 น้ำคั้นใบพืชจากฟักติดเชื้อบีโกโมไวรัส แถวที่ 10 น้ำคั้นใบพืชจากยาสูบปกติ แถวที่ 11 น้ำคั้นใบพืชจากยาสูบที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อบีโกโมไวรัสจากแตงกวาโดยแมลงหวี่ขาว แถวที่ 12 เครื่องหมายแสดงขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (Molecular weight marker) และแถวที่ 13 โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ

2.3.2 การตรวจสอบโดยเทคนิคด๊อทบลอท

หยดน้ำคั้นจากใบพืชปริมาณ 3 ไมโครลิตรบนแผ่นไนโตรเซลลูโรส ปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำมาผ่านขั้นตอนการย้อมสีโปรตีน ดังหัวข้อ 2.3.1 หลังจากเติมสารละลายสับสเตรทจะเห็นจุดสี ล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อหยุดปฏิกิริยา

<u>ผลการทดลอง</u>

เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดี M1 มาตรวจสอบพืชที่ติดเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศและพืชที่ติดเชื้อเจมินีไวรัสที่ถ่ายทอดโดยแมลงหวี่ขาว (บีโกโมไวรัส) โดยเทคนิคด๊อทบลอท พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี M1 สามารถทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะเจาะจงกับไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศในน้ำคั้นของใบมะเขือเทศที่เป็นโรคนี้รวมทั้งทำปฏิกิริยากับโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศเท่านั้นโดยให้จุดสีม่วง แต่ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับบีโกโมไวรัสชนิดอื่นๆ ได้แก่ บีโกโมไวรัสในน้ำคั้นใบฟักเป็นโรค และ แตงกวาเป็นโรค รวมทั้งไม่ทำปฏิกิริยากับพืชปกติที่ไม่เป็นโรค ดังแสดงในรูปที่ 6 แถวที่ 1ก-3ก คือน้ำคั้นใบพืชจากมะเขือเทศติดเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ แถวที่ 4ก คือน้ำคั้นใบพืชจากมะเขือเทศปกติ แถวที่ 1ข-2ข คือน้ำคั้นใบพืชจากฟักติดเชื้อเจมินีไวรัสที่ถูกถ่ายทอดโดยแมลงหวี่ขาว แถวที่ 3ข คือน้ำคั้นใบพืชจากฟักปกติ แถวที่ 4ข คือโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ แถวที่ 1ค คือน้ำคั้นใบพืชจากฟักปกติ แถวที่ 2ค คือน้ำคั้นใบพืชจากฟักติดเชื้อเจมินีไวรัสที่ถูกถ่ายทอดโดยแมลงหวี่ขาว แถวที่ 3ค คือน้ำคั้นใบพืชจากแตงกวาปกติ และแถวที่ 4ค คือน้ำคั้นใบพืชจากแตงกวาติดเชื้อเจมินีไวรัสที่ถูกถ่ายทอดโดยแมลงหวี่ขาว

2.3.3 การตรวจสอบโดยเทคนิคอิไลซ่า (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay หรือ ELISA)

2.3.3.1 การตรวจสอบโดยเทคนิคเพลทแทรป แอนติเจน อิไลซ่า

หยดน้ำคั้นจากใบพืชที่เจือจางในสารละลายคาร์บอเนต pH 9.6 ลงในหลุมถาดอิไลซ่าจากนั้นจึงเติมสารละลายบล็อกกิ้ง (2% BSA ที่ละลายใน PBST) แล้วจึงเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศที่ผลิตได้ จากนั้นจึงเติมแอนติบอดีจากแพะต่ออิมมูโนโกลบูลินของหนูที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเทสลงไป ระหว่างแต่ละขั้นตอนที่กล่าวมาทำการล้างถาดทดลองด้วยสารละลายพีบีเอส-ทวีน 20 เมื่อเติมสารละลายสับสเตรท (p-nitrophenyl phosphate) ตัวอย่างที่มีไวรัสจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของสารละลายสับสเตรท เห็นเป็นสีซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm โดยใช้เครื่องอ่านผลอิไลซ่า

<u>ผลการทดลอง</u>

เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดี M1 มาตรวจสอบพืชที่ติดเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศและพืชที่ติดเชื้อเจมินีไวรัสที่ถ่ายทอดโดยแมลงหวี่ขาว (บีโกโมไวรัส) โดยเทคนิคเพลทแทรป แอนติเจน อิไลซ่า พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี M1 สามารถทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะเจาะจงกับไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศในน้ำคั้นของใบมะเขือเทศและพริกที่เป็นโรคนี้เท่านั้น แต่ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับบีโกโมไวรัสชนิดอื่นๆ ได้แก่ บีโกโมไวรัสในน้ำคั้นใบฟัก, แตงกวา, บวบ และ กระเจี๊ยบเขียวเป็นโรค รวมทั้งไม่ทำปฏิกิริยากับพืชปกติที่ไม่เป็นโรค ดังแสดงในรูปที่ 7 น้ำคั้นใบมะเขือเทศและพริกที่ติดเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ (■) และน้ำคั้นใบฟัก แตงกวา บวบ และกระเจี๊ยบที่ติดเชื้อบีโกโมไวรัส (■) เปรียบเทียบกับน้ำคั้นใบพืชปกติ (□)

2.3.3.2 การตรวจสอบโดยเทคนิคแซนวิช อิไลซ่า

นำโพลีโคลนอลแอนติบอดีของกระต่าย จำเพาะต่อบีโกโมไวรัส เจือจาง 1:1,000 ในสารละลายคาร์บอเนต pH 9.6 หยดลงในหลุมถาดอิไลซ่า จากนั้นจึงเติมสารละลายบล็อกกิ้ง (2% BSA ที่ละลายใน PBST) แล้วจึงเติมน้ำคั้นจากใบพืช ขั้นตอนต่อไปคือการเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศที่ผลิตได้ จากนั้นจึงเติมแอนติบอดีจากแพะต่ออิมมูโนโกลบูลินของหนูที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเทสลงไป ระหว่างแต่ละขั้นตอนที่กล่าวมาทำการล้างถาดทดลองด้วยสารละลาย พีบีเอส-ทวีน 20 เมื่อเติมสารละลายสับสเตรท (p-nitrophenyl phosphate) ตัวอย่างที่มีไวรัสจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของสารละลายสับสเตรท เห็นเป็นสีซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm โดยใช้เครื่องอ่านผลอิไลซ่า

<u>ผลการทดลอง</u>

เมื่อนำโพลีโคลนอลแอนติบอดีของกระต่ายที่สร้างต่อเชื้อบีโกโมไวรัส ร่วมกับ โมโนโคลนอลแอนติบอดี M1 มาตรวจสอบพืชที่ติดเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศและพืชที่ติดเชื้อบีโกโมไวรัส โดยเทคนิคแซนวิช อิไลซ่า พบว่าสามารถตรวจไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศในน้ำคั้นใบมะเขือเทศและพริกที่เป็นโรคได้อย่างจำเพาะ

เจาะจง แต่ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับบีโกโมไวรัสชนิดอื่นๆ ได้แก่ บีโกโมไวรัสในน้ำคั้นใบฟัก, แตงกวา, บวบ และกระเจี๊ยบเขียวเป็นโรค รวมทั้งไม่ทำปฏิกิริยากับพืชปกติที่ไม่เป็นโรค ดังแสดงในรูปที่ 8 น้ำคั้นใบมะเขือเทศและพริกที่ติดเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ (■) และน้ำคั้นใบฟัก แตงกวา บวบ และกระเจี๊ยบที่ติดเชื้อบีโกโมไวรัส (■) เปรียบเทียบกับน้ำคั้นใบพืชปกติ (□)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการตรวจด้วยเทคนิคเพลทแทรป แอนติเจน อีไลซ่า และ เทคนิคแซนวิช อีไลซ่าพบว่าเทคนิคแซนวิช อีไลซ่าให้ปฏิกิริยาในการตรวจไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศที่สูงและชัดเจนกว่าการตรวจโดยเทคนิคเพลทแทรป แอนติเจน อีไลซ่า (รูปที่ 7 และ 8)

3) สรุปผลการประดิษฐ์

จากการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศได้โมโนโคลนอลที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศเท่านั้น ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับเจมินีไวรัสที่ถ่ายทอดโดยแมลงหวี่ขาวชนิดอื่นๆ รวมทั้งไวรัสชนิดอื่นๆ ที่ไม่ใช่เจมินีไวรัส เช่น ไวรัสในกลุ่มทอสโพไวรัส (Tospovirus) ได้แก่ แคปซิคัม คลอโรซิส ไวรัส (*Capsicum chlorosis virus*), วอเตอร์เมลอน ซิลเวอร์ มอทเทิ้ล ไวรัส (*Water melon silver mottle virus*), เมลอน เยลโลว์ สปอต ไวรัส (*Melon yellow spot virus*) และ โทมาโท นีโครติค ริงสปอต ไวรัส (*Tomato necrotic ringspot virus*) ไวรัสในกลุ่มโพทีไวรัส (Potyvirus) ได้แก่ ปาปาย่า ริงสปอต ไวรัส (*Papaya ringspot virus*), วอเตอร์เมลอน โมเซอิค ไวรัส-ทู (*Watermelon mosaic virus-2*) และ ชิลลี่ เวนอล มอทเทิ้ล ไวรัส (*Chilli veinal mottle virus*) ไวรัสในกลุ่มคิวโคโมไวรัส (Cucumovirus) ได้แก่ คิวคัมเบอร์ โมเซอิค ไวรัส (*Cucumber mosaic virus*) และ ไวรัสในกลุ่มโทบาโมไวรัส (Tobamovirus) ได้แก่ โทเบคโค โมเซอิค ไวรัส (*Tobacco mosaic virus*) เป็นต้น

3.1 การตรวจหาไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศโดยเทคนิคทางอิมมูโนวิทยา

ได้นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ในการประดิษฐ์นี้ มาพัฒนาวิธีตรวจหาไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศโดยใช้เทคนิคทางอิมมูโนวิทยา 4 วิธี คือ วิธีเวสเทิร์นบลอท วิธีด๊อทบลอท วิธีเพลทแทรป แอนติเจน อีไลซ่า และวิธีแซนวิช อีไลซ่า พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ในการประดิษฐ์นี้ทำปฏิกิริยาจำเพาะเจาะจงกับไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศค่อนข้างบริสุทธิ์ (partially purified TYLCV) แต่ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับบีโกโมไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ตัวอื่น เช่น บีโกโมไวรัสที่เข้าทำลาย แตงกวา ตำลึง ฟักทอง ฟัก และ บวบ

เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ในการประดิษฐ์นี้ มาตรวจหาไวรัสในน้ำคั้นของพืชที่เป็นโรคจากไวรัสในกลุ่มเจมินีไวรัสที่ถูกถ่ายทอดโดยแมลงหวี่ขาว (บีโกโมไวรัส) พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้สามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะเจาะจงกับไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศในน้ำคั้นของต้นมะเขือเทศ และ พริกที่เป็นโรคนี้เท่านั้นแต่ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับบีโกโมไวรัสตัวอื่นๆ และไม่ทำปฏิกิริยากับพืชปกติที่ไม่เป็นโรค

3.2 การตรวจหาไวรัสในแมลงพาหะ

ได้ทำการตรวจหาไวรัสในแมลงหวี่ขาวที่มีเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศซึ่งเตรียมโดยให้แมลงหวี่ขาวดูดกินใบมะเขือเทศที่ติดเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับแมลงหวี่ขาวปราศจากโรคซึ่งเตรียมโดยให้แมลงหวี่ขาวดูดกินใบมะเขือเทศปกติแทน ทั้งนี้ได้ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการประดิษฐ์นี้ในการตรวจสอบ พบว่าเมื่อตรวจสอบด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอท ตัวอย่างแมลงหวี่ขาวที่มีเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศจะให้แถบสี (band) ที่จำเพาะเจาะจงต่อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศที่โปรตีนขนาด 33 kDa ขณะที่แมลงหวี่ขาวปราศจากโรคจะไม่มีแถบสีนี้เกิดขึ้น (รูปที่ 9)

เมื่อตรวจสอบโดยเทคนิคเพลทแทรป แอนติเจน อิไลซ่า พบว่าตัวอย่างแมลงหวี่ขาวที่มีเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm เท่ากับ 0.859 ขณะที่แมลงหวี่ขาวปราศจากโรคให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm เท่ากับ 0.115 แสดงให้เห็นว่านอกจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ประดิษฐ์ขึ้นนี้ จะสามารถตรวจหาไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศในพืชที่เป็นโรคแล้ว ยังสามารถตรวจหาไวรัสในแมลงพาหะได้อีกด้วย

4) การใช้การประดิษฐ์ในทางการเกษตร

การตรวจหาไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ ด้วยวิธีการทางอิมมูโนวิทยาที่พัฒนาขึ้น (วิธีเวสเทิร์นบลอท วิธีด๊อทบลอท และ เทคนิคอิไลซ่า) มีประโยชน์อย่างมากในการศึกษาด้านต่างๆ ดังนี้

4.1 การศึกษาด้านระบาดวิทยาในแมลงพาหะและต้นพืชที่เป็นแหล่งของโรคเพื่อช่วยในการจัดการควบคุมโรค

เนื่องจากเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ เป็นปัญหาที่สำคัญมากในการปลูกมะเขือเทศซึ่งถือเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทยดังนั้นการที่มีวิธีตรวจหาที่จำเพาะเจาะจงต่อ เชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศจะทำให้สามารถศึกษาการแพร่ระบาดของโรคนี้ในมะเขือเทศและพืชอาศัยอื่นๆ รวมทั้งสามารถตรวจหาไวรัสในแมลงพาหะได้ด้วย ซึ่งจะทำให้สามารถหาแนวทางในการจัดการควบคุมโรคได้

4.2 ใช้ในการตรวจหาเพื่อคัดเลือกพันธุ์ที่ต้านทานต่อไวรัสโดยวิธีปรับปรุงพันธุ์

ซึ่งวิธีการตรวจหาไวรัสที่มีความไว รวดเร็ว ราคาถูก สามารถตรวจตัวอย่างได้คราวละมากๆ นับเป็นขั้นตอนที่จำเป็นในการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อคัดเลือกพันธุ์ที่ต้านทานต่อไวรัส

4.3 ใช้ประโยชน์ในการศึกษาวิจัยด้านอื่นๆ ที่ต้องการตรวจสอบการเข้าทำลายของไวรัส TYLCV และเจมินีไวรัสในต้นพืช

วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

เหมือนกับที่ได้อธิบายไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

ข้อถือสิทธิ

1. โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศสายพันธุ์ไทย ที่ซึ่งเป็นแอนติบอดีชนิด IgG1, IgG2a, และ κ light chain ที่มีลักษณะเฉพาะคือ ผลิตได้จากเซลล์ไฮบริโดมาโคลนที่สร้างขึ้นให้สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศสายพันธุ์ไทย

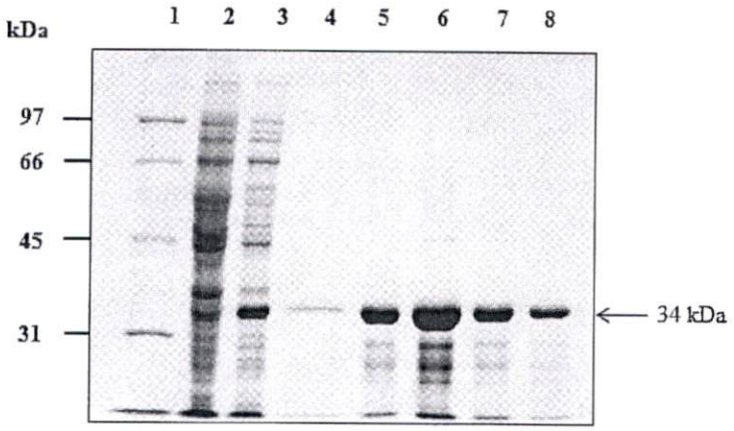
2. โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศสายพันธุ์ไทย ในข้อถือสิทธิที่ 1 ที่ซึ่ง เซลล์ไฮบริโดมาโคลนดังกล่าว มีลักษณะเฉพาะคือ สร้างขึ้นให้สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศสายพันธุ์ไทย โดยเริ่มต้นจากแอนติเจนที่สังเคราะห์ขึ้นโดยเซลล์ *E. coli* ทรานฟอร์มแม้นท์ ที่มียีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศสายพันธุ์ไทย

3. โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศสายพันธุ์ไทย ในข้อถือสิทธิที่ 2 ที่ซึ่ง ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศสายพันธุ์ไทยดังกล่าว มีลักษณะเฉพาะคือ สังเคราะห์ขึ้นโดย ไพร์เมอร์ ที่มีความจำเพาะต่อ โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศสายพันธุ์ไทย มีลำดับเบส ดังนี้

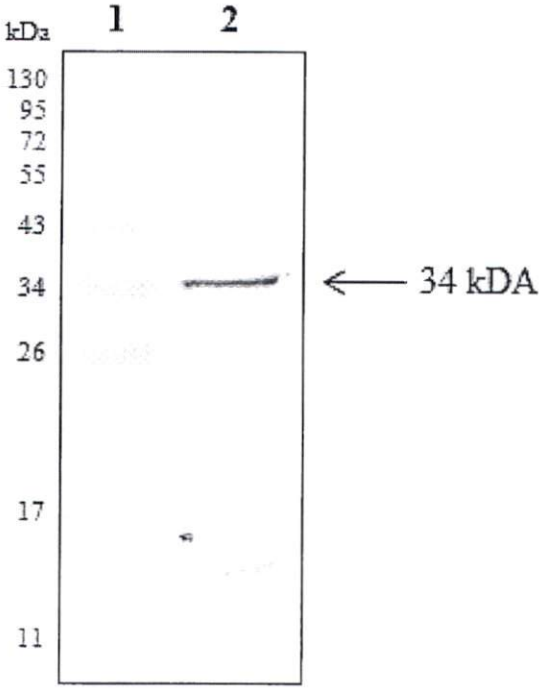
   ไพรเมอร์ CG GGA TCC ATG TCG AAG CGT CCA G และ
   ไพรเมอร์ CCC AAG CTT TTA ATT CGT CAC TGA G

4. โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศสายพันธุ์ไทย ในข้อถือสิทธิที่ 1 ที่ซึ่ง โมโนโคลนอลแอนติบอดีดังกล่าว ใช้ในการตรวจหาไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศสายพันธุ์ไทยในพืชและแมลง

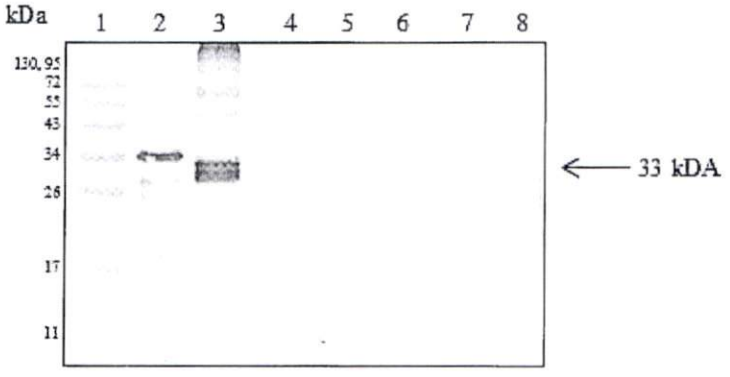
รูปที่ 1


kDa
1 2 3 4 5 6 7 8
97
66
45
31
34 kDa

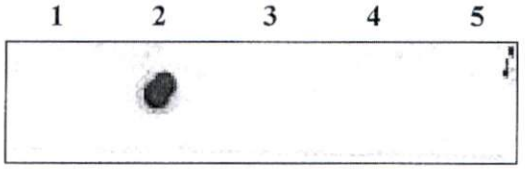
รูปที่ 2


kDa
1 2
130
95
72
55
43
34
26
17
11
34 kDA

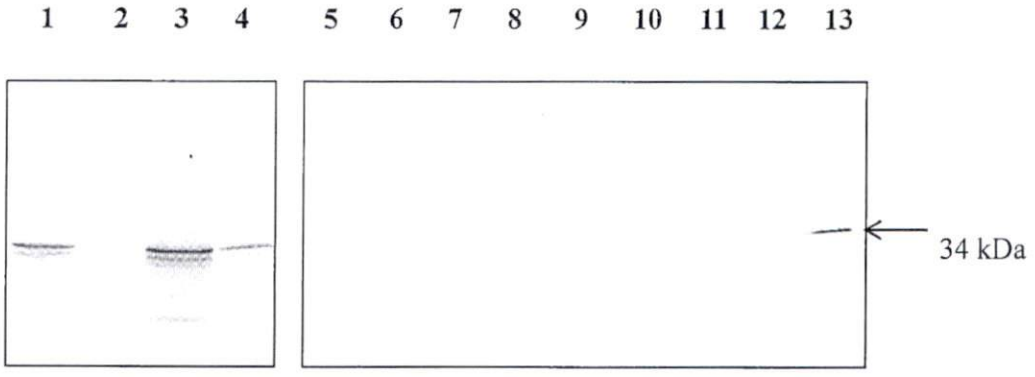
รูปที่ 3



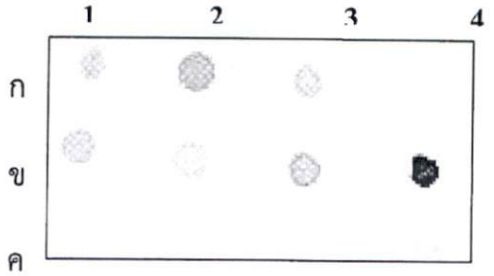
รูปที่ 4



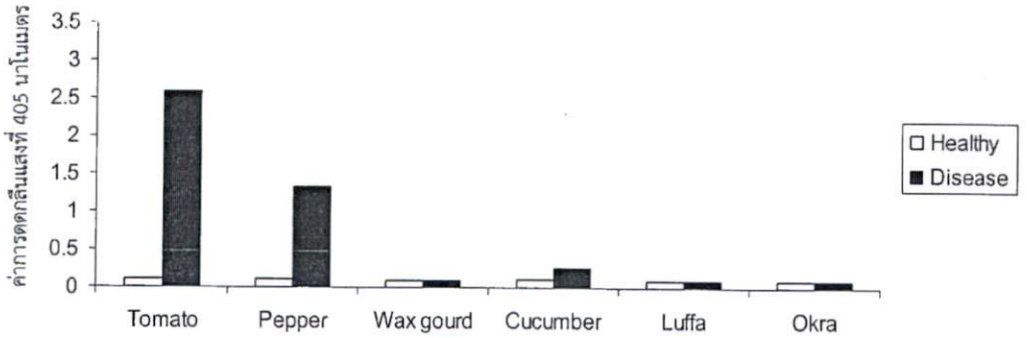
รูปที่ 5



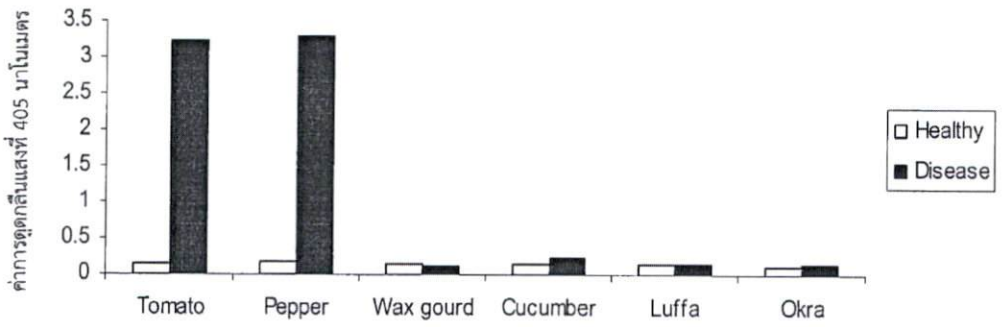
รูปที่ 6



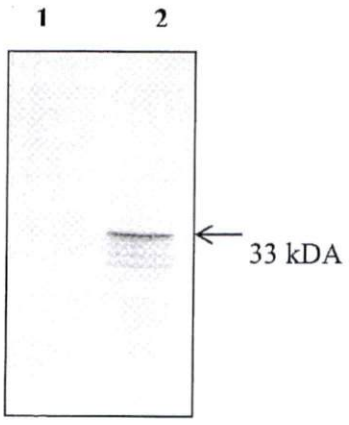
รูปที่ 7



รูปที่ 8



รูปที่ 9



บทสรุปการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้มุ่งเน้นผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศสายพันธุ์ไทย โดยโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศผลิตมาจากระบบการสังเคราะห์โปรตีนโดยเซลล์ *E. coli* ทรานฟอร์มแม้นท์ ที่มียีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศสายพันธุ์ไทย ทั้งนี้เพื่อแก้ปัญหาที่เกิดจากข้อจำกัดของการเตรียมไวรัสให้บริสุทธิ์จากต้นมะเขือเทศที่เป็นโรค การประดิษฐ์นี้ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศสายพันธุ์ไทย และพัฒนาวิธีการใช้เพื่อตรวจหาไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศในต้นพืชและแมลงที่มีประสิทธิภาพ