

การตรวจวิเคราะห์ชนิดไวรัส Nucleopolyhedrovirus ด้วย PCR-Based Typing

A Rapid Detection of Nucleopolyhedrovirus Using PCR-Based Typing

สุขลวัญ ว่องไวลิขิต^{1/}

Suchonwat Wongwilikhit^{1/}

วัชรีย์ สมสุข^{1/}

Vacharee Somsook^{1/}

ABSTRACT

Research on a rapid detection and identification of nucleopolyhedrovirus using PCR-based typing. The experiment was conducted at the Biocontrol Laboratory, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Department of Biotechnology, Thammasart University, Pathum Thani province and Department of General Science, Kasetsart University during October 2006- September 2008. Thai strains of four nucleopolyhedrovirus (NPV) pathogens namely *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid NPV (HaSNPV), *Spodoptera exigua* multiple-nucleocapsid NPV (SeMNPV), *S. litura* multiple-nucleocapsid NPV (SIMNPV) and *Trichoplusia ni* multiple-nucleocapsid NPV (TnMNPV) were detected and identified, using PCR based-typing well done by designing degenerate primers from cathepsin gene. The cathepsin forward and reverse primers were 5'-TT(AC)G AA(G)A GTC AA(G)T ATG CC(T)A T-3' and 5'-TAG CA(GC)G TCG AC(T)G CCC A(G)TG(C) G-3'. DNA fragments of polymorphism were successfully amplified and showed base pairs of 350 and 300 bp for HaSNPV, 400 bp for SeMNPV, 550 and 250 bp for SIMNPV and only 100 bp for TnMNPV. These designated primers could be used for rapid detection of four NPV which took only 16 hours compared to the total of 15 days required by host larvae process.

Key words : nucleopolyhedrovirus, NPV, *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera litura*, *Trichoplusia ni*, cathepsin gene, detection, identification, PCR based-typing

^{1/} สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม. 10900

^{1/} Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok 10900

บทคัดย่อ

การตรวจวิเคราะห์ จำแนกชนิดไวรัส nucleopolyhedrovirus ด้วย PCR-based typing ดำเนินการทดลองวิจัยที่ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่ม กัญและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการ อารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และคณะวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ รังสิต จ.ปทุมธานี และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ ระหว่างเดือน เมษายน พ.ศ. 2549 - มีนาคม พ.ศ. 2551 ทำการตรวจวิเคราะห์ จำแนกชนิดไวรัสสกุล nucleopolyhedrovirus (NPV) โรคแมลง 4 ชนิด ได้แก่ ไวรัส NPV ของหนอนเจาะสมอฝ้าย (*Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid NPV: HaSNPV) ไวรัส NPV ของหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua* multiple-nucleocapsid NPV: SeMNPV) ไวรัส NPV ของหนอนกระทู้ผัก (*S. litura* multiple-nucleocapsid NPV: SIMNPV) และไวรัส NPV ของหนอนคืบกะหล่ำ (*Trichoplusia ni* multiple-nucleocapsid NPV: TnMNPV) ด้วย วิธี PCR based-typing โดยใช้ degenerate primers ที่ออกแบบคู่ไพรเมอร์จากยีน cathepsin ที่มีลำดับเบสคือ cathepsin forward primers 5'-TT(AC)G AA(G)A GTC AA(G)T ATG CC(T)A T-3' และ cathepsin reverse primers 5'-TAG CA(GC)G TCG AC(T)G CCC A(G)TG(C) G-3' ผลขนาดลายพิมพ์ ดีเอ็นเอมีภาวะพหุสัญญาณที่ชัดเจนแสดงขนาดดี

เอ็นเอของไวรัส HaSNPV มีขนาด 350 และ 300 คู่เบสไวรัส SeMNPV มีขนาด 400 คู่เบส ไวรัส SIMNPV มีขนาด 550 และ 250 คู่เบส และไวรัส TnMNPV มีขนาด 100 คู่เบส ซึ่งไพรเมอร์นี้สามารถนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ ชนิดไวรัสเหล่านี้ได้ โดยใช้เวลาดังแต่การสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงจนกระทั่งถึงการอ่านผลใช้เวลาเพียง 16 ชม. นับเป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์ไวรัส ได้รวดเร็วกว่าวิธีการวินิจฉัยจากการตายของ หนอนแมลง ซึ่งต้องใช้เวลาไม่น้อยกว่า 15 วัน

คำหลัก : ไวรัส nucleopolyhedrovirus, NPV, *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera litura*, *Trichoplusia ni*, cathepsin gene ตรวจวิเคราะห์ จำแนก PCR based-typing

คำนำ

ไวรัสสกุล nucleopolyhedrovirus โรคของหนอนเจาะสมอฝ้าย (*Helicoverpa armigera* Hubner) หนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua* Hubner) หนอนกระทู้ผัก (*S. litura* Fabricius) และหนอนคืบกะหล่ำ (*Trichoplusia ni* Hubner) กรมวิชาการเกษตรได้มีการวิจัยไวรัสเหล่านี้มากกว่า 30 ปี พบว่าสามารถใช้ควบคุมหนอนแมลงดังกล่าวได้ดีในพืชหลายชนิด อาทิ พืชวงศ์กะหล่ำ หอม องุ่น กุหลาบ ทานตะวัน ฝ้ายและพืชวงศ์ถั่ว เป็นต้น การป้องกันกำจัดแมลงเหล่านี้ด้วยสารเคมีในปริมาณมากๆ หรือไม่ถูกวิธี มีผลให้แมลงสร้างความต้านทาน จึงไม่ประสบผล

สำเร็จในการควบคุมแมลงเหล่านี้ ก่อให้เกิดอันตรายต่อเกษตรกร และมีสารพิษตกค้างในสภาพแวดล้อมมากขึ้น การนำไวรัสมาใช้ประโยชน์เป็นสารชีววินทรีย์ควบคุมแมลงศัตรูพืชจึงเป็นทางเลือกที่เกษตรกรให้ความสนใจ ซึ่งเป็นการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี ที่ปลอดภัยและใช้กันอย่างทั่วโลก (Hunter-Fujita et al., 1998; Wongwilikhit and Nanta, 2002) การจำแนกชนิดของไวรัสมีหลายวิธี เช่น การตรวจดูลักษณะของผลึกไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน แบ่งไวรัสได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่ม *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid NPV (HaSNPV) มี 1 nucleocapsid ใน envelope เดียวกันและ *Spodoptera exigua* multiple-nucleocapsid NPV (SeMNPV), *S. litura* multiple-nucleocapsid NPV (SiMNPV), *Trichoplusia ni* multiple-nucleocapsid NPV (TnMNPV) มีหลาย nucleocapsid ใน envelope เดียวกัน ซึ่งไม่สามารถบ่งชี้ในระดับชนิด (Wongwilikhit and Somsook, 2006) การหาเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนหลังกินเชื้อเข้าไป วิธีการนี้จะต้องเลี้ยงหนอนแมลงแต่ละชนิด และใช้เวลาหลายวันกว่าจะทราบผล และถ้าหนอนเป็นพาหะของโรคแมลงอยู่จะทำให้ผลการทดลองคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริง ซึ่งวิธีการดังกล่าวไม่สามารถบ่งชี้สายพันธุ์ไวรัสได้อย่างชัดเจน ในการวิจัยนี้จึงนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาใช้เป็นเครื่องหมาย ในการตรวจจำแนกชนิดจากดีเอ็นเอ เพื่อทำการตรวจ

วิเคราะห์ชนิดของไวรัสเหล่านี้ ด้วยวิธีเทคนิค PCR based-typing เป็นการเพิ่มจำนวนเบสในลำดับที่ต้องการโดยใช้ไพรเมอร์แบบ degenerate primers ที่ออกแบบจากยีน chitinase, cathepsin และ polyhedrin ซึ่งเป็นข้อมูลในการตรวจวิเคราะห์ไวรัสที่ผลิตเป็นสารชีวภัณฑ์ เพื่อเป็นไปตามข้อกำหนดมาตรฐานของหน่วยงาน Environmental protection agency (EPA) (Jenkins and Grzywacz, 2003)

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมตัวอย่างผลึกไวรัส

ผลึกไวรัส (occlusion bodies หรือ polyhedral inclusion bodies. PIBs) คัดแยกมาจากตัวหนอนที่เป็นโรคไวรัสระยะสุดท้าย (moribund larvae) จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนกระทู้หอม หนอนกระทู้ผักและหนอนคืบกะหล่ำ ที่ห้องปฏิบัติการงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร โดยบดหนอนด้วยอุปกรณ์ที่ทำด้วยแก้ว กรองเศษซากหนอนออกด้วยสำลีปลอดเชื้อ จากนั้นนำสารละลายที่กรองได้ปั่นตกตะกอนที่แรงเหวี่ยง 3,500 ก. เป็นเวลา 15 วินาที และนำสารละลายส่วนบนมาปั่นตกตะกอนที่แรงเหวี่ยง 10,000 ก. เป็นเวลา 20-30 วินาที ดำเนินการซ้ำ 2-3 ครั้ง หรือจนกระทั่งได้ตะกอนมีสีขาว เตรียมผลึกไวรัสให้ได้ความเข้มข้น 10^8 - 10^9 ผลึก/มล.

การสกัดดีเอ็นเอจากผลึกไวรัส

สกัดดีเอ็นเอไวรัสโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Hunter-Fujita และคณะ (1998) และ Christian และคณะ (2001) ดังนี้ ผลึกไวรัส ความเข้มข้น 10^8 - 10^9 ผลึก/มล. ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมกับบัฟเฟอร์ (1 M Na_2CO_3 85 ไมโครลิตร, 0.5 M EDTA 150 ไมโครลิตร, 1 M NaCl 15 ไมโครลิตร) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที นำมาปั่นตกตะกอน ที่แรงเหวี่ยง 10,000 ก. เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนบน 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ แล้วเติมสาร release DNA (2% SDS 500 ไมโครลิตร 20 มก./มล. proteinase K 10 ไมโครลิตร 10 มก./มล. Rnase A 8 ไมโครลิตร) บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที แล้วปั่นให้ตกตะกอนที่แรงเหวี่ยง 10,000 ก. เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนบน 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ แล้วเติม phenol : chloroform : Isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ในตู้ดูดควันผสมสารละลายด้วยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 30 วินาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที ผสมสารละลายด้วยเครื่องผสมสารอีกเป็นเวลา 30 วินาที นำไปปั่นตกตะกอนที่แรงเหวี่ยง 10,000 ก. เป็นเวลา 5 นาที ได้สารละลายแยกชั้น ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่อย่างระมัดระวังในตู้ดูดควัน บันทึกปริมาตรไว้ แล้วเติม 3 M NaAc pH 5.2 อัตรา 1 : 10 (v/v) ของปริมาตรสารละลาย และเติมเอทานอลบริสุทธิ์ที่แช่เย็น 2 เท่าของปริมาตร ผสมกันโดยพลิกหลอดไปมาจนปรากฏเส้นสายดีเอ็นเอ แล้วยังนำไปบ่มที่อุณหภูมิ

20 °C. เป็นเวลา 30 นาที และนำมาปั่นตกตะกอนที่แรงเหวี่ยง 10,000 ก. เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนด้วย 70% เอทานอล 200 ไมโครลิตร ต่อก่อนนั้นนำมาปั่นตกตะกอนที่แรงเหวี่ยง 7,200 ก. เป็นเวลา 10 นาที แล้วเท 70% เอทานอลทิ้งไป ผึ่งตะกอนให้แห้ง แล้วละลายตะกอนด้วย TE buffer 20 ไมโครลิตร ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่น 260-280 นาโนเมตร และตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้อะกาโรสเจล (agarosegel) ความเข้มข้น 0.8% ใน 0.5 M TBE buffer ย้อมสีเจลด้วย ethidium bromide นำเจลไปดูภาพเจลด้วยเครื่อง UV transilluminator

การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์แบบ degenerate primers จากยีน chitinase, cathepsin และ polyhedrin โดยใช้ฐานข้อมูลลำดับเบส (DNA sequences) Genbank on <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ไวรัสชนิด HaSNPV (Khan *et al.*, 2004; Lange *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005) ไวรัสชนิด SIMNPV (Pang *et al.*, 2001) และไวรัสชนิด TnSNPV (Willis *et al.*, 2005) (Table 1) เปรียบเทียบลำดับเบสแต่ละยีนด้วยโปรแกรม Clustal W (1.83) (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) ได้ไพรเมอร์ดังนี้ 1) chitinase forward และ reverse primer 5'-GAA CGA ACC A(GC)TA CAA AGG CA-3' and 5'-TAC(T)

Table 1. Base sequence of chitinase, polyhedrin and cathepsin gene for designing degenerate primers from Genbank on <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Gene type	Accession of NPV (nucleopolydedrovirus)			
	HaSNPV	SeMNPV	SIMNPV	TnSNPV
Chitinase	AF 114795 (4 Apr, 1999)	NP__037779 (30 Mar, 2006)	-	AAZ 67432 (4 Oct, 2005)
Polyhedrin	EU 047914 (1 May, 2008)	NC__002169 (30 Mar, 2006)	AF 037262 (11 Sep, 2001)	AF 093405 (30 Nov, 1999)
Cathepsin	AF 268612 (1 Jan, 2002)	NP__037776 (30 Mar, 2006)	-	AAZ 67431 (4 Oct, 2005)

Table 2. Melting temperature (T_m) and GC content of degenerate primers

Degenerate primers / base sequence	Size (bp)	T _m (°C)	GC content (%)
Chitinase forward primer 5'-GAA CGA ACC A(GC)TA CAA AGG CA-3'	20	58 (60)	45 (50)
Chitinase reverse primer 3'-TAC(T) GAT TTC(T) AAA(G) GGA(C) GCG(T) TG-5'	20	58 (56)	45 (40)
Polyhedrin forward primer I 5'-ATT(C) AAA(G) AAT(C) GCC(TA) AAA(G) GGC A-3'	19	50 (56)	31.58 (41.37)
Polyhedrin reverse primer I 3'-AAC TTT(C) TAC AAA(G) CCA(C) ATT(C) G-5'	19	48 (56)	26.32 (47.37)
Polyhedrin forward primer II 5'-ATT(C) AAA(G) AAT(C) GCC(TA) AAA(G) GGC AA-3'	20	52 (58)	30 (45)
Polyhedrin reverse primer II 3'-AAC TTT(C) TAC AAA(G) CCA(C) ATT(C) GT-5'	20	50 (56)	25 (45)
Cathepsin forward primer 5'-TT(AC)G AA(G)A GTC AA(G)T ATG CC(T)A T-3'	19	50 (54, 56)	31.58 (42.11, 47.37)
Cathepsin reverse primer 3'-TAG CA(GC)G TCG AC(T)G CCC A(G)TG(C) G-5'	19	62 (66)	63.16 (73.68)

GAT TTC(T) AAA(G) GGA(C) GCG(T) TG-3', 2) polyhedrin forward และ reverse primer I 5'-ATT(C) AAA(G) AAT(C) GCC(TA) AAA(G) GGC A-3' and 5'-AAC TTT(C) TAC AAA(G) CCA(C) ATT(C) G-3', 3) cathepsin forward และ reverse primer 5'-TT(AC)G AA(G)A GTC AA(G)T ATG CC(T)A T-3' and 5'-TAG CA(GC)G TCG AC(T)G CCC A(G)TG(C) G-3' และ 4) polyhedrin forward and reverse primer II 5'-ATT(C) AAA(G) AAT(C) GCC(TA) AAA(G) GGC AA-3' and 5'-AAC TTT(C) TAC AAA(G) CCA(C) ATT(C) GT-3' (Table 2)

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ (Amplification) ด้วยเครื่อง DNA Thermal Cycle

เตรียมสารละลาย master mix ซึ่งประกอบด้วย ddH₂O 63.6 ไมโครลิตร 10 x PCR buffer/ MgCl₂ (25 mM) 10 ไมโครลิตร dNTP (2mM) 10 ไมโครลิตร primer forward (25 pmole/ไมโครลิตร) 4 ไมโครลิตร primer reverse (25 pmole/ไมโครลิตร) 4 ไมโครลิตร และ Taq DNA polymerase (5 ยูนิต/ไมโครลิตร) 0.4 ไมโครลิตร แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 300 ไมโครลิตร จำนวน 4 หลอดๆละ 23 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายดีเอ็นเอไวรัสแต่ละชนิด 2 ไมโครลิตร (100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) ปริมาตรรวมแต่ละหลอด 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปใส่เครื่องดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง DNA Thermal Cycle (Perkin Elmer Gene

Amp 2400) ตั้งโปรแกรม PCR ดังนี้ เริ่มต้น denaturing ที่อุณหภูมิ 94 °ซ. นาน 2 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อด้วยขั้นตอน denaturing ที่อุณหภูมิ 94 °ซ. นาน 30 วินาที annealing ที่ 56 °ซ. เป็นเวลา 1 นาที extension ที่อุณหภูมิ 70 °ซ. เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ และทำให้เกิดปฏิกิริยา dsDNA อย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 72 °ซ. เป็นเวลา 6 นาที และตั้งอุณหภูมิที่ 4 °ซ. เพื่อรอการเก็บผลิตภัณฑ์ PCR ออกจากเครื่อง แบ่งส่วนสารละลายชิ้นดีเอ็นเอมาตรวจสอบ ด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้เอกาโรสเจลความเข้มข้น 1.5% ใน 0.5 M TBE buffer โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 V เป็นเวลา 40 นาที นำเจลไปย้อมในสารละลาย ethidium bromide นาน 10 นาที ล้าง ethidium bromide ส่วนเกินออก ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอโดยนำเจลไปวางบนเครื่อง UV transilluminator ถ่ายรูปและบันทึกผล เปรียบเทียบผลของการใช้ไพรเมอร์แต่ละคู่ที่ทำให้เกิดความแตกต่างของขนาดและจำนวนแถบดีเอ็นเอระหว่างสายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน การทดลองนี้ดำเนินการระหว่างเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2549 - มีนาคม พ.ศ. 2551

ผลการทดลองและวิจารณ์

คัดเลือกยีนของไวรัส 3 ยีน ได้แก่ ยีน chitinase, polyhedrin และ cathepsin ใช้ออกแบบไพรเมอร์ แบบ degenerate primer ได้ไพรเมอร์ 4 ชุดคือ 1) chitinase forward primer และ chitinase reverse primer 2) polyhedrin

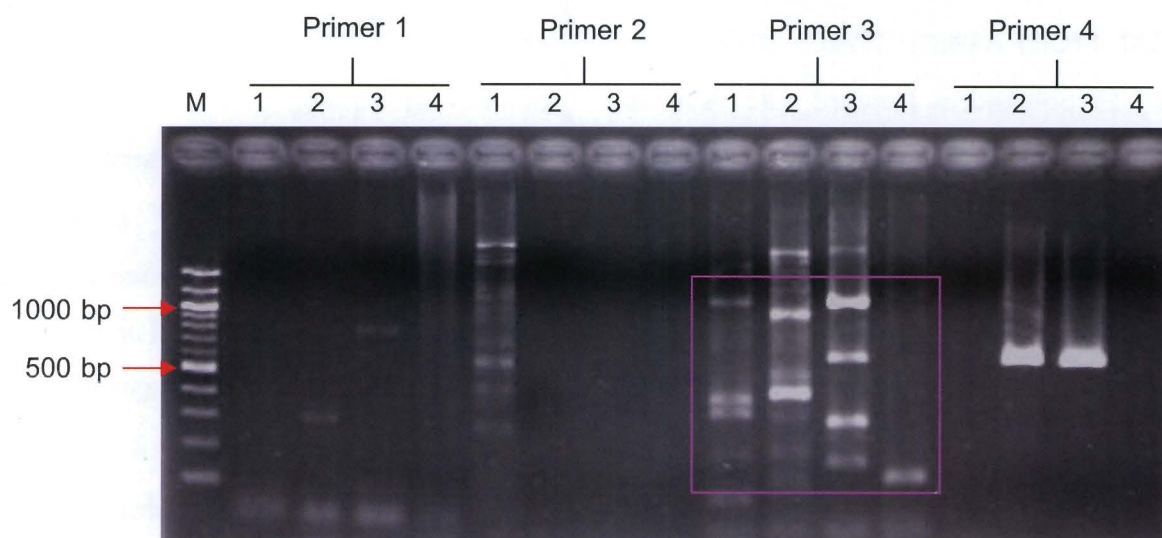


Figure 1. DNA fragments showing polymorphism among HaSNPV, SeMNPV, SIMNPV and TnMNPV on 1.5% agarose gel using degenerate primers: primer 1 chitinase forward & reverse primer, primer 2 polyhedrin forward & reverse primer I, primer 3 cathepsin forward & reverse primer and primer 4 polyhedrin forward & reverse primer II (M = Marker, 1 = HaSNPV, 2 = SeMNPV, 3 = SIMNPV and 4 = TnMNPV)

forward primer I. และ polyhedrin reverse primer I 3) cathepsin forward primer และ cathepsin reverse primer และไพรเมอร์ชุดที่ 4) polyhedrin forward primer II และ polyhedrin reverse primer II พบว่าไพรเมอร์ชุดที่ 1 และ 2 ไม่แสดงผลลายพิมพ์ของดีเอ็นเอชัดเจน (Figure 1) ทำให้ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของชนิดไวรัส ทั้งนี้เนื่องจากการเพิ่มจำนวนของเบสบริเวณที่ไพรเมอร์ทั้งสองไปจับเกิดขึ้นได้น้อยในสภาวะเงื่อนไขที่กำหนด ซึ่งอาจจะต้องใช้วิธีการออกแบบไพรเมอร์ที่แตกต่างจากเดิมซึ่งจะทำให้ค่า Tm และ ค่า GC content เหมาะสมกับสภาวะเงื่อนไขที่กำหนดหรือปรับสภาวะเงื่อนไขในการเพิ่มปริมาณเบสกรณีไพรเมอร์ชุดที่ 4 หลังทำปฏิกิริยา PCR

แล้วได้ขนาดดีเอ็นเอเพียง 2 ชนิดคือ SeMNPV และ SIMNPV ที่เท่ากัน จะต้องเพิ่มขั้นตอนโดยการใช้เทคนิค RFLP มาร่วมด้วย โดยการคัดเลือกเอ็นไซม์ตัดจำเพาะเพื่อให้ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างกัน ซึ่งก็จะสามารถตรวจวิเคราะห์ชนิดได้เช่นเดียวกับวิธีการของ Christian และคณะ, (2001) ที่ใช้เทคนิค RFLP โดยการใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากการเปรียบเทียบลำดับเบสจากยีน polyhedrin และมีลำดับและใช้เงื่อนไขปฏิกิริยา PCR ดังนี้ initial denature 95 °C เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ denature 95 °C เป็นเวลา 30 วินาที annealing 45 °C เป็นเวลา 30 วินาที extension 72 °C นาน 40 วินาที จำนวน 5 รอบ และ denature 95 °C เป็นเวลา 30 วินาที annealing 50 °C เป็นเวลา

30 วินาที extension 72 °C เป็นเวลา 40 วินาที จำนวน 30 รอบ อย่างไรก็ตามไพรเมอร์คู่นี้จะส่งผลให้เพิ่มเวลาในการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะอีกขั้นตอนหนึ่ง

ไพรเมอร์ชุดที่ 3 cathepsin forward primer และ cathepsin reverse primer ที่ออกแบบจากยีน cathepsin ให้ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันอย่างชัดเจน ปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ไวรัสที่ได้มีปริมาณสูง ทำให้จำแนกไวรัสทั้ง 4 ชนิดได้ดีกว่าไพรเมอร์อีก 3 ชุด จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอแสดงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ชัดเจนในการใช้จำแนกของไวรัส คือไวรัส HaSNPV ขนาด 350 และ 300 คู่เบส ไวรัส SeMNPV ขนาด 400 คู่เบส ไวรัส SIMNPV ขนาด 550 และ 250 คู่เบส ไวรัส TnMNPV ขนาด 100 คู่เบส และมีแนวโน้มที่จะนำไปใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อชนิดไวรัสนั้นๆได้ เนื่องจากมีความแตกต่างอย่างชัดเจน ทั้งนี้ภายใต้เงื่อนไขการทำปฏิกิริยา PCR เดียวกัน (Figure 1) และการมีสมบัติของไพรเมอร์ที่เหมาะสมกว่าไพรเมอร์คู่อื่น (Table 2)

ผลการทดลองแสดงว่าเวลาที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดไวรัส NPV ด้วยเทคนิค PCR - based typing และใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบ degenerate primer จากยีน cathepsin ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์ ตั้งแต่การสกัดดีเอ็นเอไวรัสจนถึงการอ่านผลเพียง 16 ชม. นับว่าเป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์ไวรัสได้อย่างรวดเร็วกว่าวิธีการวินิจฉัยร้อยละการตายของหนอนแมลงที่จะใช้เวลาไม่น้อยกว่า 15 วัน แสดงความแตกต่าง

ต่างได้ชัดเจน และเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยไวรัสในงานบริการได้อย่างรวดเร็ว อนึ่งยังไม่พบรายงานการวิจัยอื่นที่ใช้ยีน cathepsin ในการตรวจไวรัส NPV ทั้ง 4 ชนิด ซึ่งการตรวจวิเคราะห์สายพันธุ์ไวรัสนี้เป็นวิธีการอย่างรวดเร็วซึ่งเหมาะสมนำไปใช้ในการกำหนดมาตรฐาน และยกระดับมาตรฐานคุณภาพชีววินทรีย์เพื่อการเกษตร (Jenkins and Grzywacz, 2003)

สรุปผลการทดลอง

จำแนกชนิดของไวรัสสกุล Nucleopolyhedrovirus ทั้ง 4 ชนิด ด้วยเทคนิค PCR - based typing โดยใช้ไพรเมอร์แบบ degenerate primer ออกแบบจากยีน 3 ยีน ได้แก่ ยีน chitinase, polyhedrin และ cathepsin ออกแบบเป็นไพรเมอร์ 4 ชุด ได้แก่ 1) chitinase forward primer และ chitinase reverse primer 2) polyhedrin forward primer I และ polyhedrin reverse primer I 3) cathepsin forward primer และ cathepsin reverse primer และ 4) polyhedrin forward primer II และ polyhedrin reverse primer II พบว่าไพรเมอร์ชุดที่ 3 cathepsin forward primer และ cathepsin reverse primer ให้ผลการตรวจวิเคราะห์จำแนกได้ชัดเจนกว่าใช้ไพรเมอร์คู่อื่น โดยมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง ได้แก่ ไวรัส HaSNPV ขนาด 350 และ 300 คู่เบส ไวรัส SeMNPV ขนาด 400 คู่เบส ไวรัส

SIMNPV ขนาด 550 และ 250 คูเบส ไวรัส TnMNPV ขนาด 100 คูเบส ซึ่งมีแนวโน้มที่จะนำไปใช้ในการออกแบบไพโรมอร์ที่จำเพาะต่อชนิดไวรัส และเทคนิคนี้ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์ ตั้งแต่การสกัดดีเอ็นเอไวรัสจนถึงการอ่านผลเพียง 16 ชม. นับว่าเป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์ไวรัสได้อย่างรวดเร็วกว่าวิธีการวินิจฉัยเปอริเซ็นต์การตายของหนอนแมลงที่จะใช้เวลาไม่น้อยกว่า 15 วัน ดังนั้นการเลือกใช้วิธีการนี้จะเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยไวรัสในงานบริการได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งงานวิจัยการออกแบบไพโรมอร์จากยีน cathepsin เพื่อการตรวจไวรัส NPV ทั้ง 4 ชนิดนี้ ยังไม่พบในรายงานวิจัยอื่น

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รศ.ดร. กิตติพัฒน์ อุตโฆภกิจ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ รังสิต จ. ปทุมธานี รศ.ดร.มิ่งขวัญ มิ่งเมือง และ รศ.ดร.อมรา ทองปาน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ ที่ให้คำปรึกษาและสนับสนุนวัสดุอุปกรณ์การทดลองวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Christian, P. D., N. Gibb, A.B. Kasprzak and A. Richards. 2001. A rapid method for the identification and differentiation of *Helicoverpa* nucleopolyhedroviruses

(NPV Baculoviridae) isolated from the environment. *J. Virol. Methods* 96: 51-65.

Hunter-Fujita, F.R., P.F. Entewistle, H.F. Evans and N. E. Crook. 1998. *Insect Viruses and Pest Management*. John Wiley & Sons Ltd., England. 620 p.

Jakubowska, A.K., S.A. Peters, J. Ziemnicka, J.M. Vlak and M.M. van Oers. 2006. Genome sequence of an enhancin gene-rich nucleopolyhedrovirus (NPV) from *Agrotis segetum*: collinearity with *Spodoptera exigua* multiple NPV. *J. Gen. Virol.* 87: 537-551.

Jenkins, N.E. and D. Grzywacz. 2003. Towards the standardization of quality control of fungal and viral biocontrol agents. Pages 247-263. *In: Quality Control and Production of Biological Control Agents: Theory and Testing Procedures*. J.C. van Lenteren (ed.), CABI Publishing.

Khan, S., B. Fielding and S. Davison. 2004. Identification of three genes of *Helicoverpa armigera* single enveloped nucleopolyhedrovirus and their application in determining HaSNPV-SA phylogeny. *S. Afr. J. Sci.* 100: 301-305.

Lange, M., H. Wang, H. Zhihong and J.A.

- Jehle. 2004. Towards a molecular identification and classification system of lepidopteran-specific baculoviruses. *Virology* 325: 36-47.
- Pang, Y., J. Yu, L. Wang, X. Hu, W. Bao, G. Li, C. Chen, H. Han, S. Hu and H. Yang. 2001. Sequence analysis of the *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. *Virology* 287: 391-404.
- Willis, L.G., R. Siepp, T.M. Stewart, M.A. Erlandson and D.A. Theilmann. 2005. Sequence analysis of the complete genome of *Trichoplusia ni* single nucleopolyhedrovirus and the identification of a baculoviral photolyase gene. *Virology* 338: 209-226.
- Wongwilikhit, S. and P. Nanta. 2002. The nuclear polyhedrosis virus of cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hubner). Page 44. In: *Biennial Report 2000-2001*. Department of Agriculture, Thailand.
- Wongwilikhit, S. and V. Somsuk. 2006. Micrographics characterization of *Noctuids* nucleopolyhedroviruses DOA strains. Page 230. In : *The 18th Annual meeting of the Thai Society for Biotechnology, Biotechnology: Benefits and Bioethics*. 2-3 November 2006, Montien Riverside Hotel, Bangkok, Thailand. (Abstract)
- Zhang, C.X., X.C. Ma and Z. J. Guo. 2005. Comparison of the complete genome sequence between C1 and G4 isolates of the *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. *Virology* 333: 190-199.