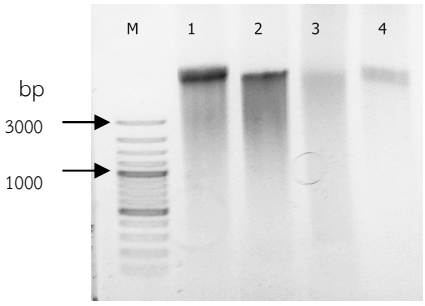
การสกัดจีโนมไวรัสและการตรวจสอบไวรัสใบด่างมันสำปะหลังด้วย Universal primers

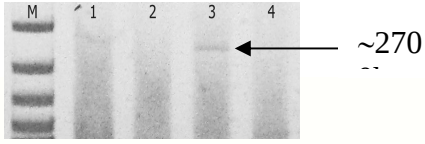
การตรวจสอบโรคที่เกิดจากไวรัสในกลุ่ม geminivirus ซึ่งเป็นไวรัสที่ไม่พบรายงานในประเทศไทย พบเฉพาะในประเทศอินเดีย ศรีลังกา และทวีปแอฟริกานั้น วิธีการตรวจสอบโดยทั่วไปจะใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอรวมโดยวิธี CTAB หรือ SDS โดยทั้งสองวิธีจะได้ดีเอ็นเอของพืชและของไวรัสรวมกัน และการตรวจสอบด้วยวิธี PCR ซึ่งบางครั้งให้ผลบวกเท็จเนื่องจากมีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอพืช ทำให้ความเชื่อมั่นในวิธีการตรวจสอบลดลง ดังนั้นการตรวจสอบต้องใช้วิธีสกัดดีเอ็นเอของจีโนมไวรัสเท่านั้นโดยที่ดีเอ็นเอของพืชไม่ปนเปื้อน และร่วมกับการตรวจสอบด้วยวิธี PCR นั้นต้องใช้ primer จำเพาะต่อไวรัสกลุ่ม geminivirus เท่านั้นโดยการออกแบบ primer ในส่วนบริเวณอนุรักษ์แบบ back to back primer เนื่องจากจีโนมของไวรัสเป็นวงปิด

ดร.เฉลิมพล ภูมิไชย และคณะ จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ได้พัฒนาวิธีการศึกษาตรวจสอบไวรัสก่อโรคใบด่างมันสำปะหลัง โดยการสกัดดีเอ็นเอของไวรัสที่เป็นจีโนมวงปิดคล้ายกับพลาสมิดดีเอ็นเอของแบคทีเรียซึ่งใช้วิธีเดียวกันได้ โดยใช้สารละลายขั้นตอนแรกเป็น homogenization buffer ประกอบด้วย Tris-HCl, NaCl, Na-EDTA, sucrose, และ beta-mercaptoethanol ในการบดตัวอย่าง และผสมกับ lysis solution ประกอบด้วย NaOH และ SDS เติมในปริมาตร 2 vol และตามด้วย precipitation solution ประกอบด้วย K-acetate ความเข้มข้นสูง ใช้ในปริมาตร 1.5 vol เพื่อตกตะกอน SDS-protein-chromosomal-DNA complex โดยการแช่น้ำแข็ง และการใช้ primer คร่อมบริเวณในส่วนอนุรักษ์ของ stem loop ซึ่งพบใน geminivirus ทุกกลุ่ม และยังพบในกลุ่ม nonavirus ด้วยแบบ back to back primer จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ PCR แบบ full genome

กระบวนการที่ได้สามารถใช้สกัดจีโนมดีเอ็นเอของไวรัสในกลุ่ม Geminivirus ได้ทุกชนิดได้รวดเร็วและครั้งละหลายตัวอย่าง และยังรวมถึง nonavirus เช่น *Banana bunchy top virus* อีกด้วย และ primer ที่จำเพาะต่อไวรัสกลุ่มนี้ทำใช้ลดการใช้ primer หลายๆคู่ แต่ยังคงความแม่ยำ

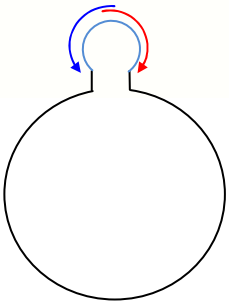


ภาพที่1 เปรียบเทียบการสกัดดีเอ็นเอโดยแบบ total DNA และวิธีสกัดแบบพลาสมิด M=DNA marker 100bp plus (Fermentas) 1=DNA มะละกอที่สกัดแบบ total DNA, 2=DNA มะละกอที่สกัดแบบ plasmid, 3=DNA มันสำปะหลังที่เป็นโรค cassava mosaic virus สกัดวิธี plasmid, 4=DNA มันสำปะหลังที่สกัดแบบ total DNA



ภาพที่2 การใช้ back to back primers ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสสาเหตุ Cassava mosaic disease M=DNA marker 100bp plus (Fermentas) 1, 2, 3, 4, DNA template จากภาพที่ 1

ฝ่ายบริหารคลัสเตอร์และโปรแกรมวิจัย (CPM)
โทร. 02 564 6700 ต่อ 3435 (ศิราวัลย์) e-mail : sirawan@nstda.or.th



back to back primers

Loop-F TAATATTACCGGATGGCCGCGC

Loop-R AATATTATACGGATGGCCGC

ภาพที่ 3 การออกแบบprimer ชนิด back tom back สำหรับการทำ PCR แบบเต็มจีโนมในขั้นตอนเดียว