



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ Heparan sulphate บนผิวเซลล์กึ่งกับบทบาทการเป็น
โมเลกุลตัวรับสำหรับโปรตีน VP37 ของไวรัสตัวแดงดวงขาว

ผศ.ดร. พงศ์ศักดิ์ ชุนแร่ สังกัด ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

พฤษภาคม 2561

สัญญาเลขที่ MRG5980197

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการHeparan sulphate บนผิวเซลล์กึ่งกับบทบาทการ
เป็นโมเลกุลตัวรับสำหรับโปรตีน VP37 ของไวรัสตัวแดงดวง
ขาว

ผู้วิจัย ผศ.ดร. พงศ์ศักดิ์ ขุนแร่ สังกัด ภาควิชา
จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี
พระจอมเกล้าธนบุรี

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว. และ สกอ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่ม ที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - เชิงพาณิชย์ (มีการนำไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ/บุคคลทั่วไป)
 - เชิงนโยบาย (มีการกำหนดนโยบายอิงงานวิจัย/เกิดมาตรการใหม่/เปลี่ยนแปลงระเบียบข้อบังคับหรือวิธีทำงาน)
 - เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง)
 - เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)
3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)

ภาคผนวก

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5980197

ชื่อโครงการ : Heparan sulphate บนผิวเซลล์กึ่งกับบทบาทการเป็นโมเลกุลตัวรับสำหรับโปรตีน VP37 ของไวรัสตัวแดงดวงขาว

ชื่อนักวิจัย: ผศ.ดร.พงศ์ศักดิ์ ขุนแร่ สังกัด ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

E-mail Address: pongsak.khu@kmutt.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี ตั้งแต่วันที่ 1 พฤษภาคม 2559 ถึงวันที่ 30 เมษายน 2561

ไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus, WSSV) เป็นเชื้อก่อโรคที่รุนแรงในกุ้ง เนื่องจากก่อให้เกิดการตายสูงภายใน 3-10 วัน และในปัจจุบันนี้ก็ยังไม่มีแนวทางการรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่อย่างไรก็ตามมีการรายงานว่าสารสกัด Sulfated galactans (SG) จากสาหร่ายสีเขียว (Gracilaria fisheri) มีความสามารถในการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้ง โดยพบว่า SG สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาวได้หลายชนิด และนอกจากนี้มีการรายงานการค้นพบโปรตีน VP37 เป็นหนึ่งในโปรตีนห่อหุ้มของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่มีความสามารถในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาบริเวณที่ทำหน้าที่รับผิดชอบต่อการยึดเกาะกับเซลล์กุ้ง รวมถึงศึกษาบทบาทหน้าที่ของ Heparan sulfate ต่อการเป็นโมเลกุลตัวรับของโปรตีน VP37 ขัดขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกุ้งได้ ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าบนผิวกุ้งมี SG-like molecule เป็นส่วนประกอบ ทั้งนี้มีการรายงานการพบสารที่มีโครงสร้างคล้าย heparin ในกุ้ง จึงอาจเป็นไปได้ว่าโปรตีน VP37 อาจจะจับกับ Heparin เพื่อทำการยึดเกาะกับเซลล์กุ้ง จึงทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค Native-PAGE และ Surface Plasmon Resonance (SRP) พบว่าโปรตีน VP37 รูปแบบ Full length และ C-terminal domain สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ Heparin ได้ด้วยค่า binding affinity (K_D) เท่ากับ 1.0 μ M และ 2.44 μ M ตามลำดับ ดังนั้นจากการทดลองนี้อาจบ่งชี้ได้ว่า SG อาจจะออกฤทธิ์ขัดขวางที่ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ Heparin ดังนั้นจึงทำการยืนยันด้วยเทคนิค SPR จากการทดลองพบว่า SG มีความสามารถในการขัดขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 รูปแบบ Full length กับ Heparin ดังนั้นจากการจากงานวิจัยนี้จึงสรุปได้ว่าโปรตีน VP37 อาจจะใช้ Heparin เป็นโมเลกุลตัวรับ (receptor) เพื่อทำการยึดเกาะกับเซลล์กุ้ง

คำสำคัญ: โกลโคซามิโนไกลแคน, โปรตีน VP37, ไวรัสตัวแดงดวงขาว, Heparin, Sulphate galactans

Abstract

Project Code: MRG5980197

Project Title: Heparan sulphate on the surface of shrimp cells is a potential receptor for VP37 from White spot syndrome virus

Investigator: Asst. Prof. Dr. Pongsak Khunrae Microbiology Department Faculty of science King Mongkut's University of Technology Thonburi

E-mail Address: pongsak.khu@kmutt.ac.th

Project Period: 2 years (1 May 2016 to 30 April 2018)

White spot syndrome virus (WSSV) is an envelope virus causing a high mortality of shrimp within 3-10 days. Currently, there is no effective way to treat or prevent white spot virus infection. However, it has been reported that sulfated galactans (SG) extract from the red seaweed (*Gracilaria fisheri*) has the ability to inhibit the infection of WSSV and SG can interact with the several proteins of WSSV. Moreover, the VP37 is one of the envelope proteins encoded by WSSV that can interact with shrimp haemocytes. Therefore, in this research, the ability to inhibit the interaction between VP37 and shrimp haemocytes by SG was investigated. The results showed that SG can inhibit the interaction between VP37 and shrimp haemocytes. Therefore, the SG-like molecule is a possible component of shrimp cell surface. The Heparin-like molecule has also been reported in shrimp. It is likely that VP37 protein may bind to Heparin to infect into the shrimp. The hypothesis was tested with Native-PAGE and Surface Plasmon Resonance (SRP) and found that VP37 protein (Full length and C-terminal domain) could interact with Heparin with a binding affinity (K_D) of 1.0 μ M and 2.44 μ M respectively. Moreover, SPR results revealed SG can inhibit the binding between VP37 protein and heparin. It indicated that SG might be used to interrupt the interaction between VP37 protein and heparin. Therefore, this study may be concluded that the VP37 protein utilizes Heparin as a receptor for binding to shrimp cells.

Keywords: Glycosaminoglycans / Heparin / Sulfated galactans / VP37 / White Spot Syndrome Virus

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (The Thailand Research Fund) สนับสนุนศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่

ขอขอบพระคุณ ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ บ.เจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน) ที่ให้ความสนับสนุนด้านสัตว์ทดลองและให้ความช่วยเหลือในการดำเนินงานวิจัยแก่ข้าพเจ้าเป็นอย่างดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	๗
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	๘
กิตติกรรมประกาศ	๙
สารบัญ	๑๑
รายการตาราง	๑๑
รายการรูปประกอบ	๑๑
ประมวลศัพท์และคำย่อ	๑๑
บทที่	
1. บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.4 ขอบเขตงานวิจัย	3
2. ทรวจเอกสาร	4
2.1 อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยและผลกระทบที่เกิดจากโรคระบาด	4
2.2 ไวรัสตัวแดงดวงขาว	6
2.2.1 กลไกการติดเชื้อของไวรัสตัวแดงดวงขาว	8
2.2.2 บทบาทของโปรตีนห่อหุ้ม (Envelope protein) ของไวรัสตัวแดงดวงขาวต่อการบุกรุกของเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน	9
2.2.3 โปรตีนห่อหุ้มขนาด 28 kDa (VP28)	9
2.2.4 โปรตีนห่อหุ้มขนาด 37 kDa (VP37)	12
2.3 สารสกัดธรรมชาติต่อบทบาทการป้องกันการติดเชื้อ	19

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4 ไกลโคซามิโนไกลแคนต่อบทบาทการเป็นโมเลกุลตัวรับ	23
3. การดำเนินงานวิจัย	25
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	25
3.1.1 เครื่องมือ	25
3.1.2 สารเคมีและเอนไซม์	26
3.1.3 เชื้อแบคทีเรีย และพลาสมิด	27
3.2 วิธีการทดลองการศึกษายาบทบาทหน้าที่และการตกผลึกโปรตีน VP37	27
3.2.1 การสร้างพลาสมิดลูกผสม pET-15b(+)-Thio-VP37 สำหรับใช้ในการศึกษา การแสดงออกของโปรตีน VP37 ในระบบ <i>E.coli</i>	27
3.2.1.1 การเตรียมพลาสมิด pET-15b(+)-Thio	29
3.2.1.2 การเชื่อมพลาสมิดและชิ้นยีนเพื่อสร้างพลาสมิดลูกผสม	29
3.2.1.3 การคัดเลือกเซลล์แบคทีเรีย <i>E.coli</i> ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม pET-15b(+)-Thio-VP37 ด้วยวิธี colony PCR และ plasmid PCR	30
3.2.1.4 การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน VP37 บนพลาสมิด ลูกผสม pET-15b(+)-Thio-VP37	30
3.2.2 การศึกษาการแสดงออกของโปรตีน VP37 ในระบบเซลล์แบคทีเรีย <i>E.coli</i>	30
3.2.2.1 การถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสม pET-15b(+)-Thio-VP37 เข้าสู่แบคทีเรีย <i>E.coli</i> ในสายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่แตกต่างกัน	30
3.2.2.2 การเหนี่ยวนำให้เซลล์แบคทีเรีย <i>E.coli</i> ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม pET-15b(+)-Thio-VP37 ผลิตโปรตีน VP37	31
3.2.2.3 การทำบริสุทธิ์โปรตีน VP37 ในระดับย่อยของการทดสอบการแสดงออก ของโปรตีน VP37	31
3.2.2.4 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วย SDS-PAGE	32
3.2.3 การทำบริสุทธิ์โปรตีน VP37 ด้วยเทคนิค Ni-NTA affinity chromatography และการกำจัดส่วนที่เป็นโปรตีน Fusion tag ออกจากโปรตีน VP37	32
3.2.3.1 การทำบริสุทธิ์โปรตีน VP37 ด้วยเทคนิค Ni-NTA affinity chromatography	32
3.2.3.2 การกำจัดโปรตีน Thioredoxin ที่เชื่อมอยู่กับโปรตีน VP37 ออกด้วยโปรตีน TEV protease	33

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2.3.3 การทำบริสุทธิ์โปรตีน VP37 ด้วยเทคนิค Gel filtration	33
3.2.4 การทดสอบหน้าที่ของโปรตีน VP37 ในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง	34
3.2.4.1 การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง (shrimp hemocyte)	34
3.2.4.2 การทดสอบการจับกันระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง ด้วยเทคนิค ELISA	34
3.2.4.3 การทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกุ้งด้วย เทคนิค Immunocytochemistry	34
3.2.5 การทดสอบศึกษาหาบริเวณบนโมเลกุลโปรตีน VP37 ที่ใช้ในการจับกับ เซลล์เม็ดเลือดกุ้ง	35
3.2.5.1 การออกแบบชิ้นส่วนต่างๆของโปรตีน VP37	35
3.2.5.2 การสร้างพลาสมิดลูกผสมของชิ้นส่วนต่างๆของโปรตีน VP37 สำหรับใช้ในการ ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย <i>E.coli</i>	35
3.2.5.3 การศึกษาการแสดงออกของชิ้นส่วนต่างๆของโปรตีน VP37 ในเซลล์แบคทีเรีย <i>E.coli</i>	35
3.2.5.4 การทำบริสุทธิ์ของชิ้นส่วนต่างๆของโปรตีน VP37 ด้วยเทคนิค Ni-NTA affinity chromatography	36
3.2.5.5 การทดสอบการจับกันระหว่างชิ้นส่วนต่างๆของโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง ด้วยเทคนิค ELISA	36
3.2.5.6 การทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างชิ้นส่วนต่างๆของโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง ด้วยเทคนิค Immunocytochemistry	36
3.2.6 การทดสอบความสามารถในการขัดขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกุ้งด้วย Sulfated galactans (SG)	36
3.2.6.1 การบ่มโปรตีน VP37 กับ Sulfated galactans	36

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2.6.2 การทดสอบความสามารถในการจับขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งด้วย Sulfated galactans ด้วยเทคนิค ELISA	37
3.2.7 การทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 รูปแบบ Full length กับ Heparin	37
3.2.7.1 การบ่มโปรตีน VP37 กับ Heparin	37
3.2.7.2 การทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 ในรูปแบบ Full length กับ Heparin ด้วยเทคนิค Native-PAGE	37
3.2.8 การทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 ในรูปแบบ Full length กับ Heparin ด้วยเทคนิค Surface Plasmon Resonance	38
3.2.8.1 การติดฉลาก Heparin ด้วย Biotin	38
3.2.8.2 การทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 ในรูปแบบ Full length กับ Heparin	38
3.2.8.3 การทดสอบความสามารถในการจับขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 ในรูปแบบ Full length กับ Heparin ด้วย Sulfated galactans	38
3.3 การตกผลึกโปรตีน VP37	39
3.3.1 การตกผลึกโปรตีน VP37 ด้วยเทคนิค under oil	39
3.3.2 การทำ X-ray diffraction	39
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	40
4.1 การศึกษาบทบาทหน้าที่ของโปรตีน VP37	40
4.1.1 การสร้างพลาสมิดลูกผสม pET-15b(+)-Thio-VP37 สำหรับใช้ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนด้วยระบบ <i>E.coli</i>	40
4.1.1.1 การเตรียมยีน VP37 และพลาสมิดสำหรับสร้างพลาสมิดลูกผสม pET-15b(+)-Thio-VP37	40

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.1.1.2	การคัดเลือกเซลล์แบคทีเรีย <i>E.coli</i> สายพันธุ์ DH5 α ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม pET-15b(+)-Thio-VP37	42
4.1.2	การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม VP37 ในเซลล์แบคทีเรีย <i>E.coli</i>	44
4.1.2.1	ผลการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม VP37 ในเซลล์แบคทีเรีย <i>E.coli</i> 4 สายพันธุ์ ได้แก่ BL21(DE3), Rosetta, Origami, และ BL21-codonPlus(DE3)-RIL	44
4.1.3	การผลิตและทำบริสุทธิ์โปรตีนลูกผสม VP37 ด้วยเทคนิค Ni-NTA affinity chromatography	46
4.1.4	การทดสอบการจับกันระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งด้วยเทคนิค ELISA และ Immunocytochemistry	47
4.2	การศึกษาหาบริเวณบนโปรตีน VP37 ที่ใช้ในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดกึ่ง	49
4.2.1	การสร้างพลาสมิดลูกผสมชิ้นส่วนต่างๆของโปรตีน VP37	49
4.2.2	ผลการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมของรูปแบบต่างๆของโปรตีน VP37 ใน <i>E.coli</i> สายพันธุ์ BL21(DE3) และ BL21-codonPlus(DE3)-RIL	53
4.3	การผลิตและทำบริสุทธิ์ชิ้นส่วนต่างๆของโปรตีน VP37 ด้วยเทคนิค Ni-NTA affinity chromatography	55
4.4	การทดสอบการจับกันระหว่างรูปแบบต่างๆของโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งด้วยเทคนิค ELISA และ Immunocytochemistry	56
4.5	การทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ Sulfated galactans	59
4.5.1	การทดสอบความสามารถในการจัดขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งด้วย Sulfated galactan	59
4.5.2	การทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ Glycosaminoglycans ด้วย Native-PAGE	60

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.5.3 การทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ Heparin ด้วยเทคนิค Surface Plasmon Resonance (SPR)	63
4.6 การทดสอบการขัดขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ Heparin ด้วย Sulfated galactans (SG) ด้วยเทคนิค Surface Plasmon Resonance (SPR)	65
4.7 การตกผลึกโปรตีน VP37	66
5 สรุปผลการทดลอง	69
5.1 การศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่ง	69
5.2 การศึกษาความสามารถในการขัดขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งด้วย Sulfated galactans	71
5.3 โปรตีน VP37 สามารถจดจำสารในกลุ่ม Heparin	73
5.4 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ Heparin ถูกขัดขวางด้วย Sulfated galactans	74
5.5 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ Heparin กับบทบาทหน้าที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่ง	75
เอกสารอ้างอิง	78

รายการตาราง

ตาราง	หน้า
4.1 ตาราง primers สำหรับใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน VP37 และชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้เป็นตำแหน่งในการสร้างพลาสมิดลูกผสม pET-15b(+)-Thio-VP37	40
4.2 restriction endonuclease และ nucleotide sequence ของ primers truncate version VP37	51

รายการรูปประกอบ

รูป	หน้า
2.1 โครงสร้างของไวรัสตัวแดงดวงขาว	7
2.2 ลักษณะดวงขาวที่พบในกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV)	8
2.3 กลไกการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของไวรัสตัวแดงดวงขาว	9
2.4 ตำแหน่งของ VP28 บน WSSV virion ด้วยเทคนิค Immuno-electron microscopy with gold-labelled antibody	10
2.5 รหัสพันธุกรรม และโครงสร้างปฐมภูมิของโปรตีน VP37	13
2.6 ตำแหน่งของโปรตีน VP37 บน WSSV virion ด้วยเทคนิค TEM immunogold-labelling method	14
2.7 ทดสอบการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ gill membrane protein ด้วยเทคนิค VOPBA (a) แสดงผลการทำ SDS-PAGE ด้วย cell lysate ในสถานะที่ไม่ทำการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีน และสถานะที่เหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีน (b) ผลการตรวจสอบปฏิสัมพันธ์ด้วยเทคนิค VOPBA	16
2.8 การทำ Neutralization assay โดยทำการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ F1ATP synthase beta subunit จากนั้นนำมาทำการบ่มกับ WSSV ก่อนทำการฉีดเข้าสู่กุ้ง และดูอัตราการตายที่เกิดขึ้น	17
2.9 แบบจำลองโครงสร้างสามมิติและการจัดเรียงโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาว	18
2.10 การจัดเรียงตัวโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาว (A) การจัดเรียงตัวของโปรตีนดินแบ่งตามความสามารถในการเกิดปฏิสัมพันธ์กับ Chitin (B) ภาพจำลองโครงสร้างสามมิติในการจัดเรียงตัวโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาว	19
2.11 โครงสร้าง Sulfated galactans ที่สกัดจากสาหร่ายสีแดง (<i>Gracilaria fisheri</i>) โดย R1 คือ H_2SO_3^- , R2 คือ H_2SO_3^- , $\text{CH}_3\text{L4M}$ และ R3 คือ H , CH_3	20
2.12 อัตราการอยู่รอดของกุ้งเมื่อได้รับ Sulfated galactans ที่ความเข้มข้นต่างๆแล้วทำการฉีดด้วย White spot syndrome virus	21
2.13 การศึกษาความสำคัญของหมู่ซัลเฟตต่อการจับของไวรัสตัวแดงดวงขาว	22

รายการรูปประกอบ (ต่อ)

รูป	หน้า
2.14 ผลการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาวกับ Sulfated galactans ด้วยเทคนิค Far-Western blot	23
2.15 ชนิดของไกลโคซามิโนไกลแคน	24
4.1 ผลการเตรียมชิ้น VP37 (A) ผล gel electrophoresis จากการเพิ่มจำนวนชิ้น VP37 ด้วยเทคนิค PCR (B) ผลจากการตัดชิ้น VP37 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI และ <i>Xho</i> I (C) ผลจากการตัดพลาสมิด pET-15b(+)-Thio ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI และ <i>Xho</i> I (M คือ แถบขนาด DNA มาตรฐาน)	41
4.2 การตรวจสอบชิ้น VP37 จากการสร้างพลาสมิดลูกผสม pET-15b(+)-Thio-VP37 (A) ผลการทำ colony PCR จากโคโลนีที่ 1-4 (B) ผลการทำ plasmid PCR จากพลาสมิดของโคโลนีที่ 1-4 (C) ผลตัดพลาสมิดลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI และ <i>Xho</i> I ของโคโลนีที่ 3 และ 4 (M คือ ขนาด DNA มาตรฐาน, P คือ positive control ของการทดลอง, N คือ พลาสมิดที่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ, C คือพลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ)	43
4.3 ผลแสดงออกของโปรตีนลูกผสม VP37 ในเซลล์แบคทีเรีย <i>E.coli</i> สายพันธุ์ BL21 (DE3), BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, Rosetta และ Origami induce ที่อุณหภูมิ 20 °C ซึ่งใช้เวลาหลังการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่ 4 ชั่วโมง และ 16 ชั่วโมง รูป A คือโปรตีนส่วนใส (supernatant) ที่จากบ่มกับ Ni-NTA bead รูป B คือ โปรตีนในส่วนของตะกอนเซลล์ (pellet) (M คือ แถบโปรตีนมาตรฐาน, 4 คือ เวลาหลังการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่ 4 ชั่วโมง, 16 คือเวลาหลังการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่ 16 ชั่วโมง)	45
4.4 ผลการทำบริสุทธิ์โปรตีนลูกผสม VP37 ด้วยเทคนิค Ni-NTA affinity chromatography และวิเคราะห์แถบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ซึ่งแสดงโปรตีน VP37 ที่ทำการชะ โปรตีนออกจาก Ni-NTA bead จำนวน 7 ครั้ง (F1-F7) (M คือ แถบโปรตีนมาตรฐาน, F(1-7) คือ จำนวนครั้งในการชะโปรตีนออกจาก Ni-NTA bead, F1(D) คือการชะโปรตีนออกจาก Ni-NTA bead ครั้งที่ 1 และทำการผสมด้วย reducing loading dry)	46
4.5 การทำบริสุทธิ์โปรตีน VP37 รูปแบบ Full length ด้วยเทคนิค Gel filtration	47

รายการรูปประกอบ (ต่อ)

รูป	หน้า
4.6	แสดงผลการทดสอบการจับกันของโปรตีน VP37 และเซลล์เม็ดเลือดกึ่งด้วยวิธี ELISA โดยใช้โปรตีน VP37 ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.2 และ 0.5 mg/ml และใช้โปรตีน Thioredoxin สำหรับเป็นการทดลองควบคุม
4.7	การทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งด้วยเทคนิค Immunocytochemistry (A) เซลล์เม็ดเลือดกึ่งบ่มกับโปรตีน VP37 (B) เซลล์เม็ดเลือดกึ่งบ่มกับ Thioredoxin ทำหน้าที่เป็น Negative control
4.8	การออกแบบบริเวณที่ครอบคลุมชิ้นส่วนต่างๆของโปรตีน VP37 (A) โครงสร้างลำดับที่สองของโปรตีน VP37 (B) บริเวณครอบคลุมรูปแบบต่างๆของโปรตีน VP37
4.9	ผลการตรวจสอบชิ้นยืน VP37 ของพลาสมิดลูกผสมรูปแบบต่างๆได้แก่ VP37(1-281), VP37(111-281), VP37(138-281), VP37(1-265) และ VP37(1-250) โดยใช้เทคนิค plasmid PCR (แถบ M คือ ขนาด DNA มาตรฐาน)
4.10	ผลการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม VP37(111-281), VP37(138-281), VP37(1-265) และ VP37(1-250) ในเซลล์แบคทีเรีย <i>E.coli</i> สายพันธุ์ BL21(DE3) และ BL21-CodonPlus(DE3)-RIL ซึ่งใช้เวลาหลังการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่ 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20 °C ในส่วนของโปรตีนทั้งหมดในเซลล์
4.11	ผลการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม VP37(111-281), VP37(138-281), VP37(1-265) และ VP37(1-250) ในเซลล์แบคทีเรีย <i>E.coli</i> สายพันธุ์ BL21(DE3) และ BL21-CodonPlus(DE3)-RIL ซึ่งใช้เวลาหลังการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่ 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20 °C ในส่วนของโปรตีนทั้งหมดในเซลล์
4.12	ผลการทำบริสุทธิ์โปรตีนรูปแบบต่างๆของโปรตีน VP37 ด้วยเทคนิค Ni-NTA chromatography ผลการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE แสดงจำนวนครั้งที่ทำการชะโปรตีนออกจาก Ni-NTA bead (F1-F5) (A) โปรตีน VP37(111-281) (B) โปรตีน VP37(138-281) (C) โปรตีน VP37(1-265) (D) โปรตีน VP37(1-250) (M คือ แถบโปรตีนมาตรฐาน, F(1-5) คือลำดับครั้งที่ทำการชะโปรตีนออกจาก Ni-NTA bead และทำการผสมด้วย native loading dye)

รายการรูปประกอบ (ต่อ)

รูป	หน้า
4.13 ผลการทดสอบการจับกันระหว่างเซลล์เม็ดเลือดกึ่งและโปรตีนรูปแบบต่างๆของโปรตีน VP37 ได้แก่ VP37(111-281), VP37(138-281), VP37(1-265) และ VP37(1-250) และโปรตีน Thioredoxin สำหรับเป็นการทดลองควบคุม ด้วยเทคนิค ELISA	57
4.14 ทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 (1-281) และ VP37(111-281) กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งด้วยเทคนิค Immunocytochemistry (A) เซลล์เม็ดเลือดกึ่งบ่มกับโปรตีน VP37(1-281) (B) เซลล์เม็ดเลือดกึ่งบ่มกับโปรตีน VP37(111-281) (C) เซลล์เม็ดเลือดกึ่งบ่มกับ Thioredoxin ทำหน้าที่เป็น negative control	58
4.15 การทดสอบความสามารถในการจับของปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งด้วย Sulfated galactans ด้วยเทคนิค ELISA โดยในการทดลองจะทำการบ่มโปรตีน VP37 ทั้งรูปแบบ Full length และ C-terminal domain กับ SG ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1 mg/ml จากนั้นนำไปบ่มกับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งทำการเพาะเลี้ยงบน 96 well plate แล้วทำการติดตามด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะกับ Histidine tag (anti-His antibody) และทำการตรวจสอบด้วย TMB substrate ก่อนทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ โดยในการทดลองมีโปรตีน Thioredoxin เป็นโปรตีนควบคุม	59
4.16 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 รูปแบบ C-terminal domain ที่ผ่านการตัด Fusion tag ออกกับ SG ที่อัตราส่วน 1:4 โมลาร์ด้วยเทคนิค Native-PAGE โดยใช้กระแสไฟฟ้า 60 Volt เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง แล้วทำการย้อมด้วย Coomassie stain เพื่อติดตามแบนโปรตีนที่เกิดขึ้น โดยรูป A แสดงโปรตีน VP37 รูปแบบ C-terminal domain ที่ทำการตัด Fusion tag เลข 1 แสดงโปรตีน VP37 รูปแบบ C-terminal domain ที่มี Fusion tag และรูป B แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 รูปแบบ C-terminal domain ที่ผ่านการตัด Fusion tag ออก กับ SG โดยเลข 1 แสดงโปรตีน VP37 รูปแบบ C-terminal domain ที่ไม่ได้ทำการบ่มกับ SG และเลข 2 แสดงโปรตีน VP37 ที่ทำการบ่มกับ SF ที่อัตราส่วน 1:4 โมลาร์	61

รายการรูปประกอบ (ต่อ)

รูป	หน้า
4.17 ผลการทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ Heparin ที่ความเข้มข้นต่างๆด้วยเทคนิค Native-PAGE โดยทำการนำโปรตีน VP37 รูปแบบ Full length มาทำการตัด Fusion tag ออก จากนั้นนำโปรตีนที่ได้มาทำการบ่มกับ Heparin ความเข้มข้นต่างๆที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมาทำการแยกโปรตีนตามขนาดด้วยเทคนิค Native-PAGE โดยจะใช้กระแสไฟฟ้า 60 Volt เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำการย้อม Coomassie stain เพื่อดูแถบโปรตีนที่เกิดขึ้น	62
4.18 ผลการทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ Heparin ด้วยเทคนิค Surface Plasmon Resonance โดยทำการตรึง porcine heparin บนผิวหน้า SA-chip จากนั้นทำการฉีดโปรตีน VP37 ที่ความเข้มข้น 20, 40 และ 70 nM แล้วดูค่า Respond unit (RU) ที่เกิดขึ้นของแต่ละความเข้มข้น จากนั้นทำการ Regenerated ผิวหน้า SA-chip ด้วย 5M NaCl แล้วนำข้อมูลที่ได้มาเข้าสู่สมการทางคณิตศาสตร์ (Fitting) ด้วยโปรแกรม BIA evaluation software ver.2.0 แบบ Heterogeneous ligand model จากการทดลองพบว่าค่าความสามารถในการจับ (Binding affinity, K_D) กันของโปรตีน VP37 กับ porcine heparin มีค่าเท่ากับ 1.0 μ M	64
4.19 ผลการทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 รูปแบบ C-terminal domain กับ Heparin ด้วยเทคนิค Surface Plasmon Resonance โดยทำการตรึง porcine heparin บนผิวหน้า SA-Chip จากนั้นทำการฉีดโปรตีน VP37 ที่ความเข้มข้น 2, 3, 5 และ 10 μ M แล้วดูค่า Respond unit (RU) ที่เกิดขึ้นของแต่ละความเข้มข้น จากนั้นทำการ Regenerated ผิวหน้า SA-chip ด้วย 5M NaCl แล้วนำข้อมูลที่ได้มาเข้าสู่สมการทางคณิตศาสตร์ (Fitting) ด้วยโปรแกรม BIA evaluation software ver.2.0 แบบ Heterogeneous ligand model จากการทดลองพบว่าค่าความสามารถในการจับ (Binding affinity, K_D) กันของโปรตีน VP37 กับ porcine heparin มีค่าเท่ากับ 2.44 μ M	64
4.20 ผลการทดสอบความสามารถในการขัดขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ porcine heparin ด้วย Sulfated galactans (SG) ด้วยเทคนิค Surface Plasmon Resonance ทำการบ่มโปรตีน VP37 กับ SG ที่ความเข้มข้นต่างๆที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการนำโปรตีนที่ได้มาฉีดผ่านผิวหน้า SA-chip ที่ทำการตรึง porcine heparin แล้วดูค่า Respond unit (RU) ที่เกิดขึ้นของแต่ละความเข้มข้น จากนั้นทำการ Regenerated ผิวหน้าด้วย 5M NaCl จากการทดลองพบว่า SG มีความสามารถในการขัดขวางปฏิสัมพันธ์	66

รายการรูปประกอบ (ต่อ)

รูป	หน้า
ระหว่างโปรตีน VP37 กับ porcine heparin แบบ Does-dependent	
4.21 ผลการหาบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการตกผลึกของโปรตีน VP37 ด้วย Nextal Tubes Suites (Qiagen) ภายใต้อากาศ parafilm oil โดยรูป A แสดงถึงผลึกของโปรตีน VP37 ที่ทำการตกผลึกด้วยบัฟเฟอร์ B3 (0.1 M Na acetate pH 4.6, 30% (v/v) MPD, 0.02 M Ca Chloride) รูป B แสดงถึงผลึกของโปรตีน VP37 ที่ทำการตกผลึกด้วยบัฟเฟอร์ C7 (2M Ammonium sulfate) และรูป C แสดงถึงผลึกของโปรตีน VP37 ที่ทำการตกผลึกด้วยบัฟเฟอร์ D10 (0.1M HEPES, 0.8M Sodium phosphate, 0.8M Potassium phosphate) ตามลำดับ	67
4.22 ผลการทดสอบผลึกของโปรตีน VP37 ที่ตกผลึกด้วยบัฟเฟอร์ B3 (0.1M Na acetate pH 4.6, 30% (w/v) MPD, 0.02M Ca Chloride) โดยรูป A แสดงผลการทดสอบการตกผลึกของโปรตีน VP37 ด้วยบัฟเฟอร์ B3 (0.1 M Na acetate pH 4.6, 30% (v/v) MPD, 0.02 M Ca Chloride) รูป B แสดงผลการทดสอบผลึกโปรตีนที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค SDS-PAGE และรูป C การทำ X-ray diffraction ของผลึกโปรตีน VP37	68

ประมวลศัพท์และคำย่อ

g	=	กรัม
kDa	=	กิโลดาลตัน
L	=	ลิตร
M	=	โมลาร์
mL	=	มิลลิลิตร
mM	=	มิลลิโมลาร์
nm	=	นาโนเมตร
MW	=	มวลโมเลกุล
OD	=	ค่าการดูดกลืนแสง
rpm	=	รอบต่อนาที
SDS	=	Sodium dodecyl sulfate
°C	=	องศาเซลเซียส
μg	=	ไมโครกรัม
μl	=	ไมโครลิตร
WSSV	=	White spot syndrome virus
RGD	=	Arginyl-glycyl-aspartic acid
ELISA	=	The enzyme-linked immunosorbent assay
GMP	=	Gill membrane protein

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนับเป็นอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศ เนื่องจากประเทศไทยมีปริมาณการส่งออกสูงเป็นอันดับต้นของโลก และสามารถสร้างรายได้ปีละหลายหมื่นล้านบาทจากการส่งออกสัตว์น้ำจำพวกกุ้งปรงแต่ง กุ้งสดแช่เย็นแช่แข็ง และทูน่ากระป๋องไปยังตลาดส่งออกหลักได้แก่ สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น และสหภาพยุโรป โดยสินค้าประเภทกุ้งและผลิตภัณฑ์เป็นสินค้าประมงหลักที่ทำรายได้โดยมีสัดส่วนมากถึงร้อยละ 70 ของมูลค่าการส่งออกสินค้าประมงทั้งหมด คิดเป็นมูลค่า 191,005.60 ล้านบาทหรือคิดเป็นร้อยละ 20.2 ของการส่งออกอาหารทั้งหมดของไทย (1) โดยในปี 2554 มีปริมาณการส่งออกกุ้ง 388,692 ตัน คิดเป็นมูลค่า 109,398 ล้านบาท (2) แต่อย่างไรก็ตามอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งก็ยังคงประสบปัญหาจากการระบาดของเชื้อก่อโรคในกุ้ง ยกตัวอย่างเช่น โรคตายด่วนที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย โรคติดเชื้อที่เกิดจากโปรโตซัว และโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสโดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคตัวแดงดวงขาว โดยการระบาดของเชื้อโรคที่เกิดจากไวรัสนั้นไม่สามารถใช้ยาปฏิชีวนะหรือสารเคมีในการรักษาได้ (3) ดังนั้นการศึกษาดังกล่าวการระบาดของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อเป็นการหาแนวทางและวิธีการป้องกันการระบาดของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

ในช่วงต้นทศวรรษ พ.ศ. 2559 ได้มีรายงานถึงการระบาดของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่รัฐควีนส์แลนด์ ประเทศออสเตรเลีย ส่งผลให้มีการปิดตัวลงของฟาร์มเพาะเลี้ยงถึง 7 แห่งก่อให้เกิดความเสียหายเป็นมูลค่า 1 พันล้านบาท (4) และเมื่อพิจารณาถึงข้อมูลในอดีตชี้ให้เห็นว่าการระบาดของไวรัสตัวแดงดวงขาวนั้นสามารถพบได้ทุกประเทศ และก่อให้เกิดความเสียหายต่อเศรษฐกิจอย่างรุนแรง โดยกุ้งที่ได้รับการติดเชื้อตัวแดงดวงขาวจะแสดงอาการจุดดวงขาวที่บริเวณส่วนหัว และหาง รวมถึงบางครั้งลำตัวอาจจะเกิดการเปลี่ยนเป็นสีแดง และตายภายใน 3-10 วัน (5) ดังนั้นทำให้นักวิจัยสนใจศึกษาดังกล่าวในการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยการศึกษาโปรตีนห่อหุ้มไวรัส (envelope protein) ที่ทำหน้าที่รับผิดชอบต่อการยึดเกาะระหว่างไวรัสกับเซลล์กุ้ง โดยจากการศึกษาก่อนหน้าได้มีการรายงานว่าไวรัสตัวแดงดวงขาวนั้นมีโปรตีนห่อหุ้มหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น VP28, VP26, VP19 และ VP37 ที่มีการรายงานว่าสามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับเซลล์กุ้งได้ (6 - 9) โดยโปรตีน VP28 สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ PmRab7, Hsc70 และ FcLec3 (10 - 12) โปรตีน VP26 สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์ได้กับ Actin (7) และโปรตีน VP37 สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์ได้กับ F1ATP synthase beta subunit และ Peritrophin-like molecule (13-14) แต่จากการรายงานถึงโมเลกุลที่อาจจะทำหน้าที่เป็นตัวรับ (receptor) ให้กับโปรตีนห่อหุ้มของไวรัสตัวแดงดวงขาวพบว่าทำการศึกษากายใต้สภาวะที่อาจ

ก่อให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนจากเทคนิคที่นำมาใช้ในการทดสอบยกตัวอย่างเช่น VOPBA, Far-Western blot เป็นต้น จึงอาจส่งผลให้ปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นอาจจะไม่ได้เกิดขึ้นจริงตามธรรมชาติ

นอกจากนี้มีการรายงานว่าสารสกัดจากธรรมชาติที่มีคุณสมบัติเป็น Sulfated polysaccharide มีความสามารถในการขัดขวางการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียและไวรัส ยกตัวอย่างเช่น สารสกัด sulfated galactans (SG) จากสาหร่ายสีแดง (*Gracilaria fisheri*) มีความสามารถในการขัดขวางการบุกรุกของไวรัสตัวแดงดวงขาว รวมถึงมีการรายงานที่ SG สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนหลายชนิดของไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ (15-16) ทั้งนี้ยังมีรายงานสารในกลุ่มไกลโคซามิโนไกลแคนทำหน้าที่ยับยั้งการเป็นโมเลกุลตัวรับให้กับไวรัสชนิดต่างๆ ได้แก่ Human Parainfluenza virus type 3 (17), Dengue virus type 2 and Yellow fever virus (18), Rift Valley Fever virus (19) และนอกจากนี้ยังมีการค้นพบสารในกลุ่มไกลโคซามิโนไกลแคน ซึ่งเป็นสารที่มีลักษณะเป็น Sulfate polysaccharide ชนิด Heparin ในกุ้ง (20-22) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าไวรัสตัวแดงดวงขาวอาจใช้ Heparin เป็นโมเลกุลตัวรับบนผิวเซลล์กุ้ง โดยอาจจะเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนห่อหุ้ม VP37 เพื่อบุกรุกเข้าสู่เซลล์กุ้ง รวมทั้งทำการศึกษหาบริเวณที่ทำหน้าที่ยับยั้งต่อการเป็น Haemocyte-binding site หรือ Heparan sulphate-binding site และนอกจากนี้ก็จะทำการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตกผลึกโปรตีน VP37 ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้จะช่วยสร้างความเข้าใจอันดีต่อกลไกการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของไวรัสตัวแดงดวงขาวได้มากขึ้น ซึ่งอาจนำไปสู่องค์ความรู้ใหม่เพื่อใช้ในการพัฒนาหาแนวทางป้องกันการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของไวรัสได้ หรือสามารถนำไปสู่การคิดค้น และพัฒนาสารโมเลกุลที่มีลักษณะใกล้เคียงกับโมเลกุลตัวรับของโปรตีน VP37 เพื่อนำมาใช้เป็นแนวทางการป้องกันการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้อีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์

1. ทำการศึกษาคำตำแหน่งของ Haemocyte-binding site หรือ Heparan sulphate-binding site บนโมเลกุลของโปรตีน VP37
2. ทำการศึกษบทบาทหน้าที่ของ Heparan sulphate ต่อการเป็นโมเลกุลตัวรับสำหรับโปรตีน VP37
3. ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตกผลึกโปรตีน VP37

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

จากการศึกษาหาโมเลกุลตัวรับ (Receptor) บนผิวเซลล์กุ้งที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน VP37 จะช่วยเพิ่มความรู้ความเข้าใจอันดีต่อกระบวนการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของไวรัสตัวแดงดวงขาว และอาจนำไปสู่การหาแนวทางป้องกัน หรือการพัฒนาวิธีการรักษาโรคที่เกิดจากไวรัสตัวแดงดวงขาวได้

ยกตัวอย่างเช่น ถ้าเกิดความรู้ความเข้าใจต่อกลไกการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของไวรัสตัวแดงดวงขาวในระดับโมเลกุลแล้วก็นำไปสู่การพัฒนาโมเลกุลขนาดเล็กที่มีลักษณะคล้ายกับโมเลกุลตัวรับ (receptor) ที่พบเพื่อนำไปใช้ในการขัดขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับโมเลกุลตัวรับ (receptor) บนผิวเซลล์กึ่งเป็นต้น

1.4 ขอบเขตงานวิจัย

1. ทำการสร้างพลาสมิดลูกผสมของโปรตีน VP37 ทั้งในรูปแบบ Full length และรูปแบบต่างๆ
2. ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีน VP37 ทั้งในรูปแบบ Full length และรูปแบบต่างๆของโปรตีน VP37 ในระบบ *E.coli* ด้วยทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วยเทคนิค Ni-NTA affinity chromatography และ gel filtration
3. ทำการศึกษาความสามารถในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งของโปรตีน VP37 ทั้งในรูปแบบ Full length และ C-terminal domain ด้วยเทคนิค ELISA และ immunocytochemistry
4. ทำการทดสอบความสามารถในการขัดขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งด้วย Sulfated galactans และทำการหาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ Sulfated galactans ด้วยเทคนิค Native-PAGE
5. ทำการทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 ในรูปแบบ Full length กับ Heparin และด้วยเทคนิค Native-PAGE
6. ทำการทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 ในรูปแบบ Full length และ C-terminal กับ Heparin ด้วยเทคนิค Surface Plasmon Resonance (SPR)
7. ทำการทดสอบความสามารถในการขัดขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 ในรูปแบบ Full length กับ Heparin ด้วย Sulfated galactans ด้วยเทคนิค Surface Plasmon Resonance (SPR)
8. ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตกผลึกของโปรตีน VP37

บทที่ 2 ตรวจเอกสาร

2.1 อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยและผลกระทบที่เกิดจากโรคระบาด

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งนับเป็นอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญต่อระบบเศรษฐกิจของประเทศไทยเป็นอย่างมาก เนื่องจากอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องจนมีการส่งออกผลผลิตกุ้งสูงเป็นอันดับหนึ่งของประเทศ (1, 23) และประเทศไทยยังเป็นผู้ส่งออกกุ้งเป็นอันดับที่ 5 ของโลกเมื่อปี พ.ศ. 2557 (24) โดยตลาดคู่ค้าที่สำคัญของไทยได้แก่ สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น สหภาพยุโรป เป็นต้น และในปี 2559 ประเทศไทยได้มีการส่งออกสินค้ากุ้งสูงถึง 209,381 ตัน มีมูลค่าถึง 69,783 ล้านบาท (23) ภายหลังการส่งออกกุ้งของไทยนั้นมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากประสบปัญหาหลายด้าน อาทิเช่น ปัญหาการกีดกันทางการค้า วัตถุดิบที่ได้จากทะเลมีปริมาณจำกัด เนื่องจากทรัพยากรประมงลดลง และการเข้มงวดในเรื่องการบังคับมาตรการ IUU (Illegal Unreported and Unregulated Fishing) อย่างจริงจังของสหภาพยุโรป การตัดสินใจ GSP สำหรับสินค้าประมง รวมถึงค่าเงินในประเทศคู่ค้าหลักทั้งสหภาพยุโรป และญี่ปุ่นอ่อนค่าลงส่งผลกระทบต่อราคาซื้อขายสัตว์น้ำ และปัญหาที่สำคัญที่ส่งผลกระทบต่อปริมาณการผลิตกุ้งของไทยคือ ปัญหาที่เกิดจากโรคระบาดในกุ้ง ที่ส่งผลให้เกิดความเสียหายอย่างมากต่อเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงจนถึงเศรษฐกิจของประเทศไทย ยกตัวอย่างเช่นปี 2554 ประเทศไทยได้มีการผลิตกุ้งที่ลดลงเนื่องจากเกิดการระบาดของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคนตายด่วน (EMS) ส่งผลให้ปริมาณการผลิตกุ้งของไทยลดลงจาก 5-6 แสนตันในปี 2554 เหลือเพียง 2.3 แสนตันในปี 2557 (25) แต่อย่างไรก็ตามจากความร่วมมือของหลายฝ่าย อาทิเช่น เกษตรกร ภาครัฐ และภาคเอกชน ในการหาแนวทางป้องกัน และเฝ้าระวังการระบาดของโรคนตายด่วน (EMS) ส่งผลให้ในปัจจุบันปริมาณการเพาะเลี้ยงกุ้งรวมถึงการส่งออกกุ้งของไทยนั้นมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้น (26) หรือผลกระทบที่เกิดจากการระบาดของเชื้อไวรัสเช่น ไวรัสตัวแดงดวงขาวที่สามารถสร้างผลกระทบต่อเศรษฐกิจของประเทศไทยได้อย่างมหาศาลส่งผลให้เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำจำเป็นต้องเปลี่ยนไปเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแทน เนื่องจากกุ้งขาวมีอัตราการขยายตัวอย่างรวดเร็ว แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันพบว่ากุ้งขาวสามารถที่จะเกิดโรคระบาดได้เช่นเดียวกับกุ้งกุลาดำ โดยโรคระบาดที่สามารถพบได้ในกุ้งขาวได้แก่ โรคหัวเหลือง (Yellow head virus) โรคทอรา (Taura syndrome) โรคไอเอชเอชเอ็นวี (Infectious Hemopoietic Hepatopancreatic Necrosis, IHNV) โรคไอเอ็มเอ็นวี (Infectious Myonecrosis virus, IMNV) และโรคตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus, WSSV) เป็นต้น (27-29)

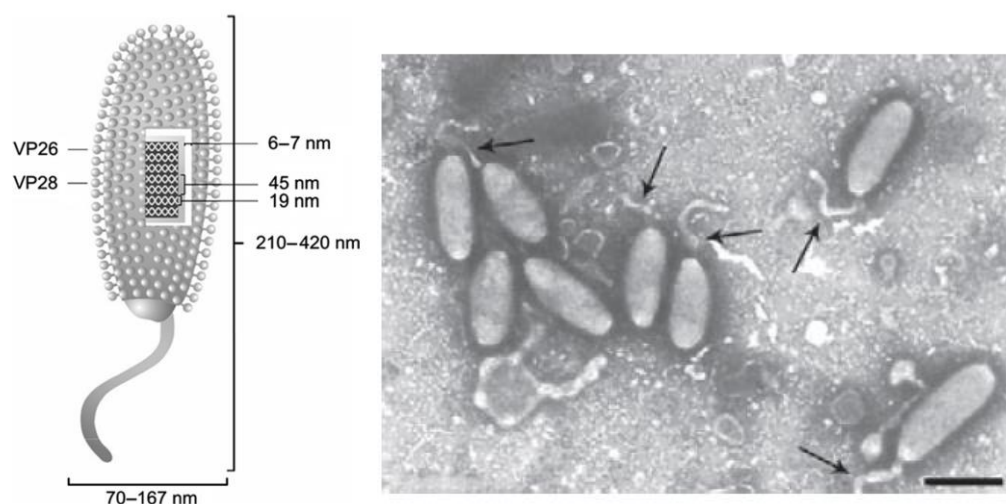
ผลผลิตกุ้งในประเทศไทยนั้นสามารถแบ่งได้เป็น 2 แหล่งได้แก่ แหล่งที่ได้จากธรรมชาติคิดเป็นร้อยละ 16.67 อีกร้อยละ 83.33 ได้มาจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของเกษตรกร แต่ในปัจจุบันผลผลิตกุ้งที่ได้จากแหล่งธรรมชาติมีปริมาณลดลง เนื่องจากทรัพยากรทางธรรมชาติมีแนวโน้มที่ลดลง แต่ผลผลิตที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น และยังคงมีแนวโน้มที่เพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่องเนื่องจากทางภาครัฐได้มีการสนับสนุนและพัฒนากิจการเพาะเลี้ยงกุ้งจนสามารถเป็นผู้ส่งออกกุ้งรายสำคัญของโลก และจากข้อมูลสถิติการประมงในปี 2556 ซึ่งเห็นว่าประเทศไทยนิยมเพาะเลี้ยงกุ้งในแถบภาคกลางประมาณ 42.59 % ภาคใต้คิดเป็น 28.13% ภาคตะวันออกคิดเป็น 17.5% และอื่นๆคิดเป็น 11.78% โดยผลผลิตกุ้งของประเทศไทยประมาณ 90% เป็นสินค้าส่งออกไปยังประเทศคู่ค้า และบริโภคภายในประเทศคิดเป็น 10% แต่ถึงอย่างไรก็ตามอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งของประเทศไทยยังคงมีความเสี่ยงที่อาจจะเกิดขึ้นจากสภาพแวดล้อมที่แปรปรวน รวมถึงการระบาดของโรค ยกตัวอย่างเช่น ในช่วงปี 2554 ประเทศไทยได้ประสบปัญหาการระบาดของโรคตายด่วน (EMS) ทำให้ผลผลิตกุ้งของไทยลดลงอย่างรวดเร็ว โดยก่อนหน้านี้ในช่วงปี 2549-2555 ประเทศไทยมีผลผลิตกุ้งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงประมาณ 5 แสนตันต่อปี และลดลงเหลือ 3.25 แสนตันในปี 2556 และลดต่ำสุดเหลือเพียง 2.3 แสนตันในปี 2557 และในช่วงปี 2558 แนวโน้มผลผลิตกุ้งไทยมีแนวโน้มที่ดีขึ้นจากการร่วมมือกันแก้ปัญหาของทางเกษตรกร ภาครัฐและภาคเอกชน ทำให้ประเทศไทยสามารถที่จะรับมือและป้องกันการระบาดของโรคตายด่วนได้ (EMS) โดยการปรับโครงสร้างฟาร์มและวิธีการจัดการอย่างเป็นระบบ ซึ่งมีการปรับเปลี่ยนวิธีการเพาะเลี้ยง รวมทั้งมีลูกกุ้งที่มีคุณภาพที่ดีขึ้น ส่งผลให้แหล่งผลิตกุ้งที่สำคัญของไทยในภาคตะวันออกและภาคใต้ฝั่งอ่าวไทยและฝั่งทะเลอันดามันให้ผลผลิตกุ้งที่เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด หรือแม้แต่ปัญหาที่เกิดจากการระบาดของเชื้อไวรัสก็ยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญที่ยังไม่สามารถหาแนวทางป้องกันหรือรักษาได้ โดยโรคระบาดที่เกิดจากไวรัสที่สำคัญในกุ้งได้แก่โรคตัวแดงดวงขาว ยกตัวอย่างเช่นปลายปี 2537 มีการค้นพบการระบาดของโรคตัวแดงดวงขาวในประเทศไทยทางฝั่งภูมิภาคตะวันออก จังหวัดจันทบุรี ตราด ภาคใต้ฝั่งตะวันออก จังหวัดนครศรีธรรมราช ปัตตานี และฝั่งตะวันตก จังหวัดตรัง จากการระบาดของโรคตัวแดงดวงขาวในประเทศไทยส่งผลกระทบอย่างมากต่อเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยง และภาคเศรษฐกิจของประเทศ ส่งผลให้เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งนั้นเปลี่ยนจากการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแทน เนื่องจากและในช่วงปลายปี 2559 พบการระบาดครั้งแรกของไวรัสตัวแดงดวงขาวในรัฐควีนส์แลนด์ ประเทศออสเตรเลีย ส่งผลให้เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งจำเป็นต้องปิดฟาร์มชั่วคราวถึง 7 แห่งเพื่อเป็นการจำกัดและป้องกันการระบาดของไวรัสตัวแดงดวงขาวไปยังพื้นที่อื่น คิดเป็นมูลค่าความเสียหาย 1 พันล้านบาท และนอกจากนี้ทางประเทศออสเตรเลียยังประกาศการนำเข้ากุ้งสดจากต่างประเทศโดยเฉพาะในแถบเอเชีย เนื่องจากมีการสันนิษฐานว่าการระบาดของไวรัสตัวแดงดวงขาวนั้นน่าจะมาจากประเทศในแถบเอเชีย โดยประเทศที่เคยมีการรายงานถึงการระบาดของไวรัสตัวแดงดวงขาวได้แก่ เวียดนาม จีน มาเลเซีย และไทย (4)

2.2 ไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus, WSSV)

ไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus, WSSV) ไวรัสที่มีความรุนแรง สามารถสร้างความเสียหายได้อย่างมหาศาล โดยเฉพาะผลกระทบที่เกิดกับอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทั่วโลก การระบาดของไวรัสตัวแดงดวงขาวถูกพบครั้งแรกในปี 2535 ที่ประเทศไต้หวัน จากนั้นปี 2536 พบที่ประเทศญี่ปุ่นในฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้ง *Penaeus japonicus* โดยเรียกไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคว่า penaeid rod-shape DNA virus (PRDV) หรือ rod-shaped nuclear virus of *P. japonicus* (RV-PJ) (30-31) ต่อมาปลายปี 2537 พบการระบาดของไวรัสตัวแดงดวงขาวในประเทศไทย โดยเรียกโรคนี้ว่า systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV) การระบาดของไวรัสตัวแดงดวงขาวสามารถบุกรุกเข้าสู่สัตว์น้ำจำพวกครัสเตเชียนได้แก่ กุ้งน้ำจืด กุ้งน้ำเค็ม และปู โดยมีสัตว์น้ำเชื้อได้แก่ โรติเฟอร์ (Rotifer), อาร์ทีเมีย (Artemia salina), โคพีพอด (Copepod), โพลีคีต (Polychaete worm), ตัวอ่อนแมลง (larvae insect) และหอยทะเล (Marine mollusk) เป็นต้น (32)

ไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นไวรัสชนิดดีเอ็นเอสายคู่ (double-stranded DNA virus) ที่มีผนังห่อหุ้ม (envelope) ขนาดใหญ่ ลักษณะเป็นแท่ง (rod-shaped) ขนาด 80 -120 x 250 -380 นาโนเมตร (33) ดังแสดงในรูปที่ 2.1 โดยในอดีตไวรัสตัวแดงดวงขาวถูกจัดอยู่ในวงศ์ Baculoviridae แต่จากการศึกษาเพิ่มเติมพบว่าไวรัสตัวแดงดวงขาวมีส่วนที่ยื่นออกมาคล้ายหางจึงได้มีการจัดกลุ่มไวรัสตัวแดงดวงขาวใหม่โดย International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) ให้อยู่ในสกุล *Whispovirus* วงศ์ Family *Nimaviridae* (34-35) ในปัจจุบันได้มีการรายงานข้อมูลสารพันธุกรรมทั้งหมดของไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ 4 สายพันธุ์โดยแบ่งตามแหล่งที่ทำการคัดแยกเชื้อได้แก่ สายพันธุ์จากประเทศจีน (WSSV-CN; GenBank Accession AF332093) มีขนาด 305 กิโลเบส ประเทศไทย (WSSV-TH; GenBank Accession AF369029) มีขนาด 293 กิโลเบส (35) ไต้หวัน (WSSV-TW; GenBank Accession AF440570) มีขนาด 307 กิโลเบส และเกาหลี (WSSV-KR; GenBank Accession JX515788) มีขนาด 296 กิโลเบส โดยข้อมูลพันธุกรรมของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่แยกได้จากแต่ละประเทศมีความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสถึง 97-99% และมี GC content ประมาณ 41% สำหรับข้อมูลทางพันธุกรรมทั้งหมดของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่แยกได้จากประเทศไทยจะประกอบด้วย 181 ส่วนที่สามารถแสดงออกเป็นโปรตีนได้ (open reading frame, ORF) ซึ่งจะสามารถถอดรหัสออกมาเป็นโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 50 - 6,077 กรดอะมิโน และในปัจจุบันพบว่ามี ORFs เพียง 6% เท่านั้นที่สามารถถอดรหัสเป็นโปรตีนแล้วมีความคล้ายคลึง (Homology) กับโปรตีนอื่นที่อยู่ในฐานข้อมูล โดยโปรตีนส่วนมากที่ทำการถอดรหัสออกมามักเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ nucleotide metabolism, DNA replication และ protein modification ส่วน ORFs ที่เหลือพบว่าเมื่อถอดรหัสออกมาเป็นโปรตีนแล้วไม่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนอื่นๆที่มีการรายงานไว้ในฐานข้อมูล (36) และเมื่อมี

การศึกษายีนอื่นๆของไวรัสตัวแดงดวงขาวเพิ่มเติม พบว่ามีหน้าที่เกี่ยวข้องกับ Immediate early genes, DNA metabolism-related genes, latency-related genes, ubiquitination-related genes และเกี่ยวข้องกับ anti-apoptosis pathway (37-40)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของไวรัสตัวแดงดวงขาว (41)

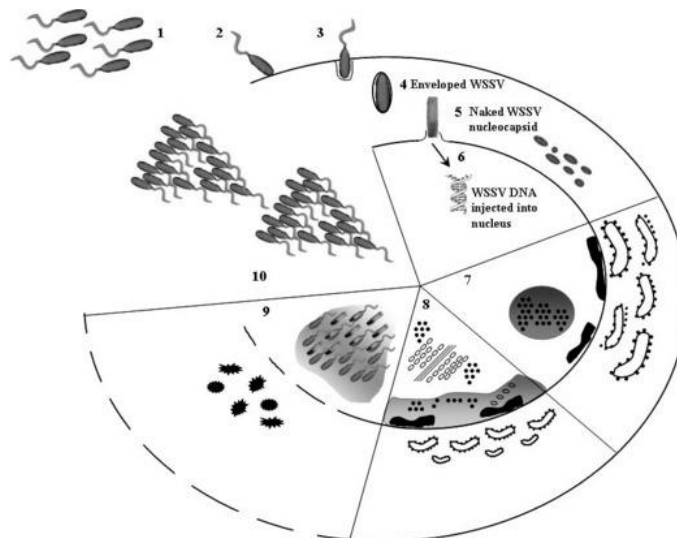
ไวรัสตัวแดงดวงขาวจะประกอบไปด้วยโครงสร้างโปรตีนหลัก 3 ส่วน ได้แก่ส่วนที่เป็นโปรตีนห่อหุ้ม (envelope protein) ส่วนที่เป็น Tegument protein และส่วนที่เป็น นิวคลีโอแคพซิด (nucleocapsid protein) ซึ่งโปรตีนทั้ง 3 ชนิดนี้จะเกี่ยวข้องกับการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของไวรัส โดยโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นโปรตีนห่อหุ้มได้แก่ VP28, VP19 และ VP24 เป็นต้น โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นนิวคลีโอแคพซิดได้แก่ VP26 และ VP15 โดยกึ่งที่มีการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจะแสดงอาการจุดดวงขาวที่บริเวณใต้เปลือกที่บริเวณส่วนหัวและด้านข้างลำตัวส่วนหางขนาด 0.5 - 2 มิลลิเมตร และกึ่งตลอดทั้งตัวมีสีแดงเรื่อๆชมพูจนถึงเข้ม นอกจากนี้ไวรัสตัวแดงดวงขาวจะเข้าทำลายระบบเนื้อเยื่อชั้นเอกโตเดม (Ectoderm) และมีโซเดม (Mesoderm) โดยจะทำให้เนื้อเยื่อของเซลล์เกิดการบวมโต รวมถึงทำให้ตัวมีขนาดเล็กลง (รูปที่ 2.2) และจะตายภายใน 3-10 วัน (5)



รูปที่ 2.2 ลักษณะดวงขาวที่พบในกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) (5)

2.2.1 กลไกการติดเชื้อของไวรัสตัวแดงดวงขาว

เนื่องจากไวรัสตัวแดงดวงขาวมีลักษณะเป็นไวรัสที่มีโปรตีนห่อหุ้ม (envelope virus) ดังนั้นกลไกการติดเชื้อของไวรัสจะอาศัยปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนห่อหุ้ม (envelope protein) กับโมเลกุลตัวรับ (receptor) บนผิวเซลล์กุ้งเพื่อสนับสนุนให้ไวรัสบุกรุกเข้าสู่เซลล์ โดยกระบวนการบุกรุกเข้าสู่เซลล์จะเริ่มจากไวรัสใช้ส่วนที่เป็นโปรตีนห่อหุ้ม (envelope virus) ไปทำการยึดเกาะกับโมเลกุลตัวรับบนผิวเซลล์กุ้ง จากนั้นไวรัสจะทำการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ด้วยกระบวนการเอนโดไซโทซิส (endocytosis) โดยโปรตีนห่อหุ้ม (envelope protein) จะเกิดการรวมกับเยื่อหุ้มเอนโดโซม (endosome membrane) และทำการปลดปล่อยนิวคลีโอแคพซิดเข้าสู่ไซโทพลาสซึม (cytoplasm) จากนั้นนิวคลีโอแคพซิดจะถูกย่อยและเคลื่อนเข้าสู่บริเวณนิวเคลียสเพื่อทำการส่งสารพันธุกรรมของไวรัสเข้าสู่นิวเคลียส ซึ่งภายในนิวเคลียสจะเกิดกระบวนการจำลองตัวเองของไวรัสเพื่อเพิ่มจำนวนไวรัสดังแสดงในรูปที่ 2.3 (41) จากรูปที่ 2.3 จะเห็นได้ว่ากระบวนการยึดเกาะของไวรัสที่เกิดจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนห่อหุ้มกับโมเลกุลตัวรับบนผิวเซลล์นั้นเป็นกระบวนการสำคัญที่จะสนับสนุนให้เกิดการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ ดังนั้นการศึกษาความสำคัญของโปรตีนห่อหุ้มของไวรัสที่มีความสามารถในการยึดเกาะกับโมเลกุลตัวรับบนผิวเซลล์จึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากหากเราทราบและเข้าใจถึงปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นนี้อาจจะสามารถนำไปสู่แนวทางการพัฒนาและหาวิธีป้องกันการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของไวรัสได้



รูปที่ 2.3 กลไกการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของไวรัสตัวแดงดวงขาว (41)

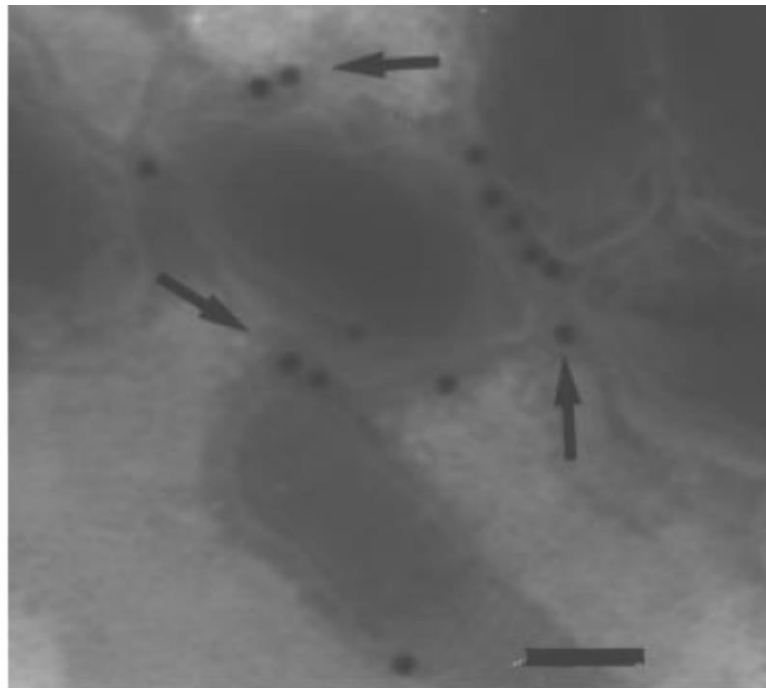
2.2.2 บทบาทของโปรตีนห่อหุ้ม (Envelope protein) ของไวรัสตัวแดงดวงขาวต่อการบุกรุกเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

กระบวนการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของไวรัสจะอาศัยโปรตีนห่อหุ้มของไวรัสไปทำการยึดเกาะกับโมเลกุลตัวรับบนผิวเซลล์ก่อนเกิดกระบวนการเอนโดไซโทซิส (endocytosis) เข้าสู่เซลล์ ดังนั้นกระบวนการยึดเกาะระหว่างโปรตีนห่อหุ้มของไวรัสกับโมเลกุลบนตัวรับบนผิวเซลล์จึงเป็นขั้นตอนสำคัญที่สนับสนุนให้ไวรัสเกิดการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการค้นพบโปรตีนของไวรัสที่ทำหน้าที่เป็นโปรตีนห่อหุ้มมากกว่า 35 ชนิด (36) ยกตัวอย่างเช่น โปรตีน VP28 และ VP37

2.2.3 โปรตีนห่อหุ้มขนาด 28 kDa (VP28)

โปรตีน VP28 เป็นโปรตีนไวรัสที่มีการศึกษาอย่างแพร่หลาย เนื่องจากในปี 2000 โดย Van Hulten และคณะ ได้ทำการศึกษาโปรตีนของไวรัสโดยทำการคัดแยกไวรัสจากกุ้งที่ติดเชื้อมาทำการบ่มกับ NP40 เพื่อทำการกำจัดส่วนที่เป็นโปรตีนห่อหุ้มเทียบกับไวรัสที่ไม่ได้บ่มกับ NP40 จากนั้นนำมาทำการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่าไวรัสตัวแดงดวงขาวประกอบด้วยโปรตีนที่สำคัญอย่างน้อย 4 ชนิด ได้แก่โปรตีนขนาด 28 kDa (VP28), 26 kDa (VP26), 24 kDa (VP24) และ 19 kDa (VP19) และเมื่อนำมาทำการตรวจสอบด้วยโพลีโคลนอลแอนติเซรัมที่จำเพาะต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวพบว่าโปรตีนที่มีขนาด 28 และ 19 kDa สามารถพบได้เฉพาะในไวรัสที่ไม่ได้ทำการบ่มกับ NP40 และโปรตีนขนาด 26 และ 24 kDa นั้นสามารถพบได้เฉพาะในไวรัสที่ทำการบ่มกับ NP40 ดังนั้นจากงานวิจัยชิ้นนี้สามารถบ่งชี้ได้ว่าโปรตีน VP28 และ VP19 ทำหน้าที่เป็นโปรตีนห่อหุ้มให้กับไวรัสตัวแดงดวงขาว และโปรตีน

VP26 และ VP24 ทำหน้าที่เป็นนิวคลีโอแคพซิด (42) ต่อมาในปี 2002 ได้ทำการยืนยันถึงตำแหน่งของโปรตีน VP28 ในการเป็นโปรตีนห่อหุ้มของไวรัสด้วยเทคนิค Immuno-electron microscopy with gold-labelled antibody (43) ดังแสดงในรูปที่ 2.4 โดยพบว่าโปรตีน VP28 นั้นเป็นโปรตีนห่อหุ้มที่พบบนผิวเซลล์ไวรัส จากนั้น Van Hulten และคณะ ได้ทำการศึกษาหน้าที่ของโปรตีน VP28 โดยทำการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน VP28 ใน baculovirus expression vector system แล้วนำแอนติบอดีที่ได้ไปทำการบ่มกับไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ความเข้มข้นต่างๆก่อนนำไปฉีดเข้าสู่กุ้งแล้วดูอัตราการตายที่เกิดขึ้น ซึ่งจากการทดลองพบว่าแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน VP28 นั้นสามารถทำให้กุ้งตายช้าลงได้ตามความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงสามารถที่จะสรุปได้ว่าโปรตีน VP28 เกี่ยวข้องกับกระบวนการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของไวรัส (44)



รูปที่ 2.4 ตำแหน่งของ VP28 บน WSSV virion ด้วยเทคนิค Immuno-electron microscopy with gold-labelled antibody (43)

เมื่อทราบและแน่ใจแล้วว่าโปรตีน VP28 นั้นเป็นโปรตีนห่อหุ้มที่สำคัญของไวรัสตัวแดงดวงขาวจึงมีนักวิจัยสนใจทำการศึกษาถึงความสามารถในการเกิดปฏิสัมพันธ์กับเซลล์กุ้ง โดยในปี 2004 โดย Guahua Yi และคณะพบว่าโปรตีน VP28 นั้นสามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับเซลล์กุ้งได้ โดยการติดฉลากโปรตีน VP28 ด้วย EGFP (VP28-EGFP) จากนั้นนำไปทดสอบในการจับกับ Lymphoid organ พบว่าโปรตีน VP28-EGFP นั้นสามารถที่จะเกิดปฏิสัมพันธ์กับ Lymphoid organ ได้โดยมี pH ที่เหมาะสมคือ pH 6.0 จากนั้นทางคณะผู้วิจัยได้ลองทำการทดสอบหาความสัมพันธ์ระหว่างไวรัสตัว

แดงดวงขาวกับโปรตีน VP28 โดยใช้เทคนิค Competitive ELISA โดยทำการบ่มไวรัสตัวแดงดวงขาวกับโปรตีน VP28-EGFP ที่ความเข้มข้นต่างๆ จากการทดลองพบว่าความสามารถในการจับของไวรัสตัวแดงดวงขาวกับ Lymphoid organ จะลดลงตามความเข้มข้นของโปรตีน VP28-EGFP ที่เพิ่มขึ้นและในขณะเดียวกันทางผู้วิจัยได้ทำการบ่มโปรตีน VP28-EGFP กับไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ความเข้มข้นต่างๆก็พบว่าความสามารถในการจับของโปรตีน VP28-EGFP นั้นลดลงตามความเข้มข้นของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เพิ่มขึ้นเช่นกัน ดังนั้นจากงานวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่าโปรตีน VP28 สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับเซลล์กุ้งได้และการจับของโปรตีน VP28 เป็นแบบจำเพาะ (44) ต่อมาในปี 2006 โดย Kallaya และคณะได้รายงานไว้ว่า GTP-binding protein Rab 7 ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) อาจจะทำหน้าที่เป็นโมเลกุลตัวรับให้กับโปรตีน VP28 โดยได้ทำการผลิตโปรตีนใน *Escherichia coli*. แล้วนำมาทดสอบปฏิสัมพันธ์กับเซลล์กุ้งโดยใช้เทคนิค Virus overlay protein binding assay (VOPBA) โดยนำเอา shrimp haemocyte membrane protein มาทำการแยกขนาดด้วย SDS-PAGE จากนั้นถ่ายโปรตีนไปสู่แผ่น nitrocellulose membrane ก่อนจะทำการบ่มกับโปรตีนลูกผสม VP28 (rVP28) และทำการตรวจสอบด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน VP28 ซึ่งจากการทดสอบนี้พบว่าโปรตีน VP28 สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนของ shrimp haemocyte membrane protein ได้ทั้งหมด 3 ขนาด ได้แก่ 14 kDa, 25 kDa และ 30 kDa จากนั้นนำโปรตีนทั้ง 3 ขนาดนี้ไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Mass spectrophotometry พบว่าโปรตีนขนาด 14 kDa นี้มีความคล้ายกับ Cyclic AMP-regulated protein-like protein ขนาด 30 kDa มีความคล้ายกับ Haemocyte kazal-type proteinase inhibitor และขนาด 25 kDa มีความคล้ายกับ GTP-binding protein (Rab7) นอกจากนี้เขาทำการยืนยันความสำคัญของ PmRab7 ต่อการยึดเกาะและบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของไวรัสโดยการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Rab7 ก่อนนำไปทำการบ่มกับ WSSV ซึ่งจากการทดลองพบว่าการแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Rab7 มีความสามารถในการขัดขวางปฏิสัมพันธ์ได้ทั้งโปรตีนลูกผสม VP28 และไวรัสตัวแดงดวงขาวกับ shrimp haemocyte membrane protein โดยความสามารถในการขัดขวางจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เพิ่มขึ้น (10) แต่อย่างไรก็ตามปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP28 กับ PmRab7 นั้นก็ยังคงไม่น่าใช่ปฏิสัมพันธ์หลักที่ทำให้ไวรัสเกิดกระบวนการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ เนื่องจากการรายงานถึงหน้าที่การทำงานของโปรตีน Rab7 ว่าเกี่ยวข้องกับกระบวนการที่ทำให้เกิด late endosome ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไวรัสเกิดกระบวนการเอนโดไซโทซิส (endocytosis) เข้าสู่เซลล์ก่อนแล้ว โปรตีน Rab7 จึงทำหน้าที่ทำให้มีความเป็นไปได้ว่าปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP28 กับ Rab7 ไม่ใช่ปฏิสัมพันธ์แรกที่ทำให้ไวรัสเกิดการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ นอกจากนี้มีการรายงานถึงโมเลกุลตัวรับ (receptor) บนผิวเซลล์กุ้งที่อาจจะทำหน้าที่เป็นโมเลกุลตัวรับ (receptor) ให้กับโปรตีน VP28 ได้แก่ Hsc70 และ FcLec3 เป็นต้น (11-12)

2.2.4 โปรตีนห่อหุ้มขนาด 37 kDa (VP37)

โปรตีนห่อหุ้มขนาด 37 kDa (VP37) หรือเรียกอีกอย่างว่า VP281 หรือ VP33 (GenBank accession number AF411364) ถูกค้นพบครั้งแรกในปี 2002 โดยกลุ่มของ Canhua Huang และคณะ (45) จากการทำบริสุทธิ์อนุภาคไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV virion) (46) ทำการแยกโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาวตามขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบแบนโปรตีนเกิดขึ้นมากกว่า 24 แบน โดยปรากฏแบนที่ขนาด 37 kDa เป็นครั้งแรกขึ้นมา จึงนำไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF Mass spectrophotometry ซึ่งพบว่าโปรตีนที่ขนาด 37 kDa ไม่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนในฐานข้อมูลจึงทำการศึกษาเพิ่มเติมพบว่า start codons และ stop codons ของยีน *VP37* อยู่บริเวณนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 14169 และ 142538 ตามลำดับ ซึ่งยีน *VP37* ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 843 bp และสามารถแปลงเป็นโปรตีนได้ขนาด 281 amino acid ซึ่งคิดเป็นน้ำหนักโมเลกุลได้เท่ากับ 31 ± 5 kDa และมี TATA box อยู่ที่ตำแหน่งที่ 46 nucleotide จากตำแหน่ง upstream ของตำแหน่งการเกิด translation พบ polyadenylation signal (AATAAA) ที่ตำแหน่ง 101 จากตำแหน่ง downstream ของตำแหน่งการหยุด translation นอกจากนี้โปรตีน VP37 มีคุณสมบัติเป็นกรดเนื่องจากมีค่า Isoelectric point (pI) เท่ากับ 4.69 โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *VP37* และโครงสร้างปฐมภูมิของโปรตีน VP37 จะแสดงในรูปที่ 2.5

(a) GTA CAC TCT GTT AAT TTT TTC AAA CAA TAA ACT AAC CAC CTT GTA TAT
TATA box

```

TTT TGT TTG TTT GCA ACA CCC TTT TTA TGA TAC CAT TAA GAC ACG ATG
                                     M
GCG GTA AAC TTG GAT AAT GTT CTT GTG AAT ATC AAC AAC AAG GAT GAA
A   V   N   L   D   N   V   L   V   N   I   N   N   N   K   D   E
GAT CTT ACA AAA CTC GTA TCC GAG GCA ATA AAG CGG CGA GCT AAA ACT
D   L   T   K   L   V   S   E   A   I   K   R   R   A   K   T
GTA TTT GAC ACT AAA AAT CAA GCA GGG TTT GAC ATG AGA CGT CAA GTT
V   F   D   T   K   N   Q   A   G   F   D   M   R   R   Q   V
GAA GCT GCA TTA TAT GAA GCA ATA TCC AAA AAG AAA GAA AAG GCC ATA
E   A   A   L   Y   E   A   I   S   K   K   K   E   K   A   I
AAG GCA TTC GAT GAG CTC ATA CAA GAA AGA GGT GAT GAA ATT ACA CCT
K   A   F   D   E   L   I   Q   E   R   G   D   E   I   T   P
TTG ACT ACA ATG CAG TAT GAA GAG TGG GTA AAC CGT ACA ATA ACT CCC
L   T   T   M   Q   Y   E   E   W   V   N   R   T   I   T   P
TCA TTG ACG ACT GAA AAT TTA TTA GGT GAT GTT GAG CAC GCC GAT TTT
S   L   T   T   E   N   L   L   G   D   V   E   H   A   D   F
TTA CTG GAC CGA ATG ACA CCC GTA AGC GAG GAA GAT ATT GAA GGT TTC
L   L   D   R   M   T   P   V   S   E   E   D   I   E   G   F
GCT GCT TCT ACT TTT AAG GAG GTA TCA GAT TCA AAA ACT GCA ACA GTC
A   A   S   T   F   K   E   V   S   D   S   K   T   A   T   V
ATA GTT AAG GCA GAT TGT GAA ACG GGG GAT ATC GAT GAA GTG TAT AAT
I   V   K   A   D   C   E   T   G   D   I   D   E   V   Y   N
CTT GCA CCA TCA TTC GGC GTC ACT CAA GAA ATT AAA ATA TAT AGG TCA
L   A   P   S   F   G   V   T   Q   E   I   K   I   Y   R   S
AAC AAT TCC TCG GAA TTG GAT AAT GTC GCA GAT TCT TTC CAT ATT TAT
N   N   S   S   E   L   D   N   V   A   D   S   F   H   I   Y
AAA ATT TCT GCA ACA GAT AGC GAC AGT GGC AAT ACT AAA AAA TTG TTG
K   I   S   A   T   D   S   D   S   G   N   T   K   K   L   L
TAT GGG TTA AGG AAT AAA AAA GCA GGT TAT ACG TGT TTG TGT AGA ATT
Y   G   L   R   N   K   K   A   G   Y   T   C   L   C   R   I
TTT GCA GAA ATT GAA TCA GAT GGG ATT ATG GCC AAT ACA AAT ATC GGT
F   A   E   I   E   S   D   G   I   M   A   N   T   N   I   G
GTC GCT GAA AAC AAC AGA GAT GAA ATT GAT GAA AAC GAA GAA GGT AAA
V   A   E   N   N   R   D   E   I   D   E   N   E   E   G   K
TAT GGT TTT TTA ATA CCC AAA CAA CCA GCT GGT GCA AAA TTG ATC ATC
Y   G   F   L   I   P   K   Q   P   A   G   A   K   L   I   I
TAC TTC TTT TTA AAT TGT TGG ACA TAA AAA ATG ATA TTT TAT ACA ATG
Y   F   F   L   N   C   W   T   *
CAA CCC TTC CTT GGG TTT CTG GTC TTT TCT GTG CTT ATT GTA ATT GTA
ATG ACT GTA TTA GCT GTA TAC ACT GCA CCT CAA ATA AAG
                                     polyadenylation signal

```

รูปที่ 2.5 รหัสพันธุกรรม และ โครงสร้างปฐมภูมิของโปรตีน VP37 (45)

จากรูปที่ 2.5 แสดงให้เห็นถึงตำแหน่ง RGD motif (Arg-Gly-Asp) ในโครงสร้างปฐมภูมิของโปรตีน VP37 ที่ตำแหน่ง 75-77 โดย RGD motif ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการยึดเกาะของเซลล์ (cell attachment domain) (47) ซึ่งจากข้อมูลนี้บ่งชี้ได้ว่าโปรตีน VP37 อาจจะทำหน้าที่เป็นโปรตีนห่อหุ้มของไวรัสตัวแดงดวงขาว ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาหาตำแหน่งของโปรตีน VP37 บนอนุภาคของไวรัสด้วยเทคนิค TEM immunogold-labelling method และทำการติดตามตำแหน่งของโปรตีน VP37 ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน VP37 ซึ่งจากการทดลองพบว่าตำแหน่งของโปรตีน VP37

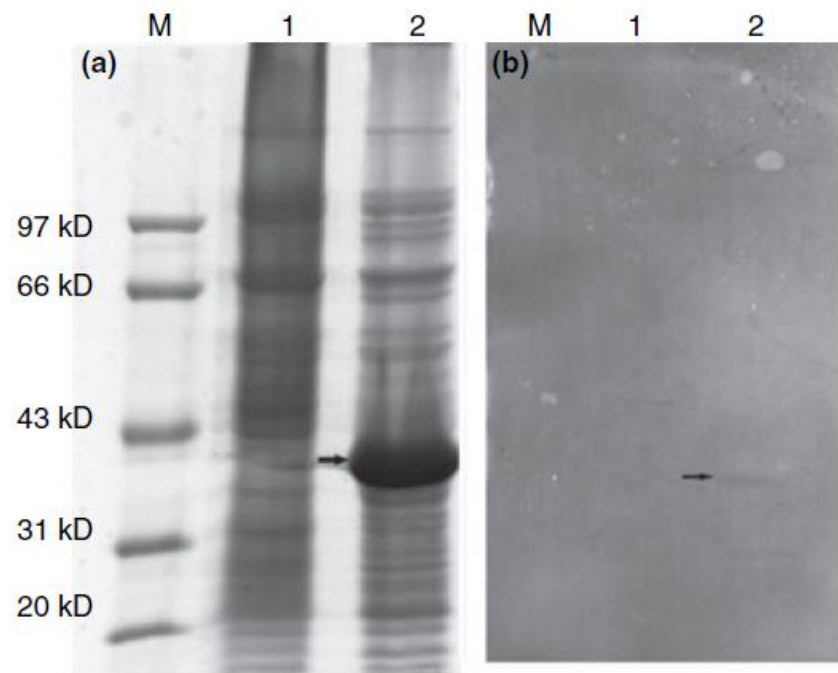
นั้นอยู่บริเวณรอบๆอนุภาคไวรัสตัวแดงดวงขาวดังแสดงในรูปที่ 2.6 ซึ่งจากการทดลองนี้บ่งชี้ได้ว่าโปรตีน VP37 เป็นหนึ่งในโปรตีนห่อหุ้มของอนุภาคไวรัสตัวแดงดวงขาว (45)



รูปที่ 2.6 ตำแหน่งของโปรตีน VP37 บน WSSV virion ด้วยเทคนิค TEM immunogold-labelling method (45)

เมื่อทราบแล้วว่าโปรตีน VP37 เป็นหนึ่งในโปรตีนห่อหุ้มของอนุภาคไวรัสตัวแดงดวงขาวจึงทำให้นักวิจัยสนใจที่จะทำการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์กุ้งเพื่อศึกษาหาหน้าที่ของโปรตีน VP37 ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Yan Liang และคณะ ที่ทำการศึกษาโปรตีนห่อหุ้มของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับเซลล์กุ้งได้ โดยทำการแยกโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยเทคนิค SDS-PAGE และทำการย้ายไปสู่ nitrocellulose membrane จากนั้นทำการบ่มกับ DIG-shrimp cell ซึ่งจากการทดลองพบว่าปรากฏแถบโปรตีนขนาด 37 kDa, 39 kDa และมากกว่า 97 kDa 2 แถบ และจากการทำ Mass spectrometry พบว่าขนาดแถบโปรตีนที่ 37 kDa เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากยีน *VP281* ดังนั้นจากการทดลองนี้สามารถบ่งชี้ได้ว่าโปรตีน VP37 นั้นสามารถที่จะเกิดปฏิสัมพันธ์กับเซลล์กุ้งได้ (48) แต่จากการศึกษานี้เป็นการทดสอบภายใต้เทคนิคที่อาจก่อให้เกิดการเสียชีวิตของโปรตีนดังนั้นผลที่เกิดขึ้นอาจจะไม่ได้เกิดขึ้นจริงในสภาวะธรรมชาติ แต่อย่างไรก็ตามได้มีนักวิจัยอีกกลุ่มสนใจศึกษาหน้าที่และบทบาทของโปรตีน VP37 โดยทำการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน VP37 ขึ้นก่อนนำไปทำการบ่มกับไวรัสตัวแดงดวงขาวและทำการฉีดเข้าสู่กุ้งเพื่อดูอัตราการตายที่เกิดขึ้น พบว่าไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ทำการบ่มกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน VP37 สามารถทำให้กุ้งเกิดการตายช้าลงได้ ดังนั้นจากงานวิจัยนี้จึงบ่งชี้ได้ว่าโปรตีน VP37 อาจจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของไวรัสตัวแดงดวงขาว (49) ดังนั้นจากงานวิจัยก่อนหน้านี้บ่งชี้ว่าโปรตีน VP37 เป็นหนึ่งในโปรตีนห่อหุ้มของไวรัสตัวแดงดวงขาว ที่น่าจะเกิด

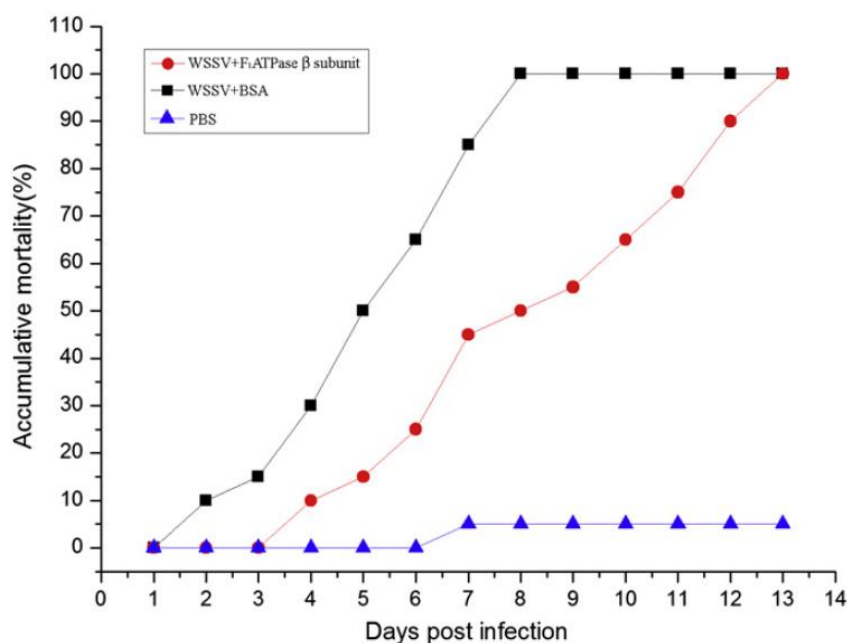
ปฏิสัมพันธ์กับเซลล์กึ่งได้ จึงมีนักวิจัยได้ทำการผลิต และทำบริสุทธิ์โปรตีน VP37 ในระบบเซลล์ยีสต์ (*Pichia pastoris*) รวมถึงทำการนำโปรตีน VP37 ที่ผลิตจากเซลล์ยีสต์มาทดสอบการจับกับ gill membrane protein ของกึ่งด้วยเทคนิค ELISA ซึ่งจากการทดลองพบว่าโปรตีน VP37 ที่ทำการผลิตจากเซลล์ยีสต์สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ gill membrane protein ของกึ่งได้ (50) ต่อมาในปี 2008 Q.-H. Liu และคณะได้ทำการยืนยันปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งโดยทำการผลิตโปรตีน VP37 ในระบบเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* แล้วนำโปรตีนที่ผลิตได้มาทำการทดสอบด้วยเทคนิค VOPBA ซึ่งจากการทดลองพบว่าโปรตีน VP37 นั้นสามารถที่จะเกิดปฏิสัมพันธ์กับ gill membrane protein ของกึ่งได้แสดงในรูปที่ 2.7 และนอกจากนี้ได้ทำการศึกษาความสำคัญของโปรตีน VP37 ต่อการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของไวรัสโดยการนำโปรตีน VP37 มาทำการบ่มกับไวรัสตัวแดงดวงขาวแล้วทำการฉีดเข้าสู่กึ่งเพื่ออัตราการตายที่เกิดขึ้น ซึ่งจากการทดลองพบว่าอัตราการตายของกึ่งลดลงสูงถึง 40% ดังนั้นจากงานวิจัยนี้สามารถบ่งชี้ได้ว่าโปรตีน VP37 อาจจะทำให้เกิดปฏิสัมพันธ์กับเซลล์กึ่งได้ (9) แต่ปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นนี้ยังคงไม่ทราบถึงโมเลกุลตัวรับบนผิวเซลล์กึ่งที่ทำหน้าที่รับผิดชอบต่อการจับกับโปรตีน VP37 และนอกจากนี้จากงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นนี้ยังไม่สามารถที่จะยืนยันได้ว่าในสภาวะธรรมชาติโปรตีน VP37 นั้นจะเกิดปฏิสัมพันธ์กับเซลล์กึ่งได้จริงหรือไม่ เนื่องจากการรายงานก่อนหน้านี้ทำการทดสอบภายใต้สภาวะที่โปรตีนอาจเกิดการเสียสภาพจากเทคนิคการทำบริสุทธิ์โดยใช้ guanidine และถึงแม้ว่าจะมีการ refold กลับมาแต่ก็ยังไม่สามารถยืนยันได้ว่าโปรตีนที่ refold กลับมานั้นคงรูปร่างตามธรรมชาติของโปรตีนหรือไม่ หรือเทคนิคที่นำมาทดสอบที่ทำภายใต้สภาวะที่โปรตีนเกิดการเสียสภาพจากการทำ SDS-PAGE แต่เนื่องจากโปรตีน VP37 นั้นมีแนวโน้มที่จะเกิดปฏิสัมพันธ์กับเซลล์กึ่งได้ รวมถึงจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ทราบว่าโปรตีน VP28 ก็เป็นหนึ่งในโปรตีนห่อหุ้มที่มีบทบาทสำคัญต่อการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของไวรัส แต่ถึงแม้ว่าจะมีการขัดขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP28 กับเซลล์กึ่งก็ยังคงไม่สามารถขัดขวางหรือยับยั้งการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของไวรัสได้ 100% เช่นเดียวกับการขัดขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์กึ่งจึงยังคงทำให้โปรตีน VP37 นั้นมีความน่าสนใจ



รูปที่ 2.7 ทดสอบการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ gill membrane protein ด้วยเทคนิค VOPBA (a) แสดงผลการทำ SDS-PAGE ด้วย cell lysate ในสถานะที่ไม่ทำการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีน และสถานะที่เหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีน (b) ผลการตรวจสอบปฏิสัมพันธ์ด้วยเทคนิค VOPBA (9)

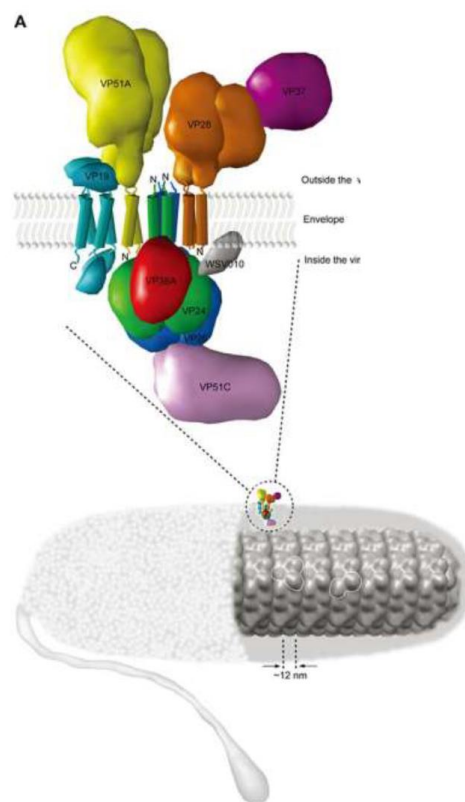
ต่อมาในปี 2010 ได้มีนักวิจัยทำการศึกษาโมเลกุลตัวรับบนผิวเซลล์กุ้งที่ทำหน้าที่รับผิดชอบต่อการยึดเกาะของโปรตีนห่อหุ้ม VP37 ว่าอาจจะเป็น F1 ATP synthase beta subunit (BP53) โดยทำการทดสอบด้วยเทคนิค VOPBA ซึ่งจะทำให้การแยกโปรตีนของ gill membrane protein ด้วยเทคนิค SDS-PAGE แล้วนำไปทำการบ่มกับ DIG-WSSV ซึ่งจากการทดลองพบว่าไวรัสตัวแดงดวงขาวสามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ gill membrane protein ได้ที่โปรตีน 2 ขนาดได้แก่ขนาด 53 kDa และ 200 kDa และจากการทำ Mass spectrometry พบว่าแบนโปรตีนขนาด 53 kDa มีความคล้ายกับโปรตีน F1 ATP synthase beta subunit ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงทำการยืนยันความสำคัญของโปรตีน F1ATP synthase beta subunit ด้วยการทำให้ Competitive ELISA, Co-immunoprecipitation และ Neutralization assay พบว่า F1ATP synthase beta subunit นั้นสามารถลดและขัดขวางการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ ดังนั้นจากงานวิจัยนี้จึงบ่งชี้ได้ว่าโปรตีน F1ATP synthase beta subunit นั้นอาจจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของไวรัสโดยทำหน้าที่เป็นโมเลกุลตัวรับให้กับไวรัสตัวแดงดวงขาว (13) ซึ่งจากงานวิจัยนี้พบว่าโปรตีน F1ATP synthase beta subunit ทำหน้าที่เป็นโมเลกุลตัวรับให้กับไวรัสตัวแดงดวงขาว ดังนั้นจึงอยากทราบว่าโปรตีนใดของไวรัสตัวแดงดวงขาว ที่สามารถจดจำและเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน F1ATP synthase beta subunit ได้ ดังนั้น Wenbin Zhang และคณะ จึง

ทำการศึกษาโดยใช้เทคนิค VOPBA และ Pull down assay พบว่าโปรตีน VP37 สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์ได้กับโปรตีน F1 ATP synthase beta subunit ได้ และเมื่อทำการวิเคราะห์ GMP ที่ขนาดโปรตีน 53 kDa ด้วยเทคนิค Mass spectrometry ก็พบว่าเป็นโปรตีน F1ATP synthase beta subunit จึงทำการยืนยันความสำคัญของโปรตีน F1ATP synthase beta subunit โดยการทำการ neutralization assay ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ F1ATP synthase beta subunit พบว่าสามารถชะลอการตายของกุ้งได้ (รูปที่ 2.8) ดังนั้นจากงานวิจัยนี้จึงเป็นงานวิจัยชิ้นแรกที่รายงานว่โปรตีน VP37 นั้นสามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ gill membrane protein ของกุ้งได้ผ่านโปรตีน F1ATP synthase beta subunit (13) นอกจากนี้ Chen Li และคณะได้ทำการศึกษากฎสัมพันธ์ในระดับเซลล์ด้วยเทคนิค immunofluorescent co-localization assay พบว่าปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับโปรตีน F1ATP synthase beta subunit สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กันได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการยืนยันได้ว่าโปรตีน VP37 อาจจะใช้ F1ATP synthase beta subunit เป็นโมเลกุลตัวรับในการยึดเกาะกับเซลล์กุ้ง (51) แต่จากงานวิจัยที่รายงานถึงโมเลกุลตัวรับของโปรตีน VP37 ยังคงทำการศึกษาภายใต้สภาวะที่โปรตีนอาจเกิดการเสียสภาพทำให้การศึกษหาโมเลกุลตัวรับของโปรตีน VP37 นั้นยังคงเป็นสิ่งที่ต้องทำการศึกษาต่อไป แต่อย่างไรก็ตามนอกเหนือจากโปรตีน F1ATP synthase beta subunit ได้มีการรายงานว่า Peritrophin-Like protein ของ *Litopenaeus vannamei* (LvPT) ทำหน้าที่เป็นโมเลกุลตัวรับของโปรตีน VP37 เช่นเดียวกันจากการทำ yeast two hybrid assay (14)

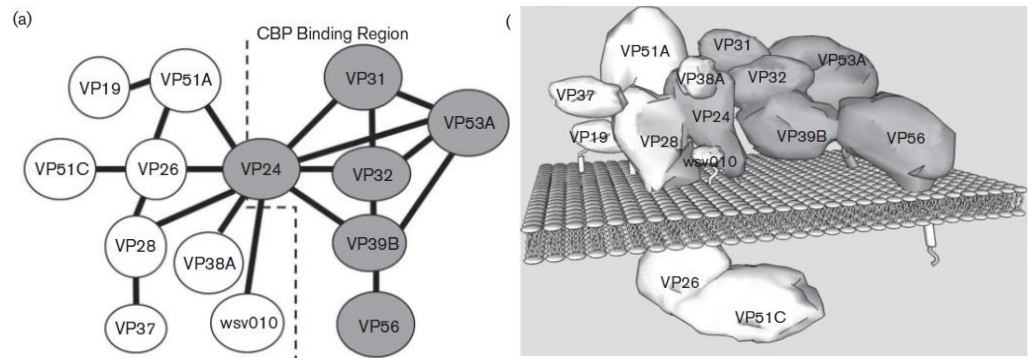


รูปที่ 2.8 การทำ Neutralization assay โดยทำการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ F1ATP synthase beta subunit จากนั้นนำมาทำการบ่มกับ WSSV ก่อนทำการฉีดเข้าสู่กุ้งและดูอัตราการตายที่เกิดขึ้น (13)

นอกจากนี้ทางผู้วิจัยพบว่าไวรัสตัวแดงดวงขาวประกอบด้วยโปรตีนห่อหุ้มหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการยึดเกาะกับเซลล์กิ้งเช่น VP28, VP26, VP24, VP19 และ VP37 (6 - 9) แต่จากการศึกษาก่อนหน้าพบว่าโปรตีน VP28 สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับเซลล์กิ้งได้ผ่านการเกิดปฏิสัมพันธ์กับ PmRab7, Hsc70 และ FcLec3 (10 - 12) แต่เมื่อทำการจัดขวางปฏิสัมพันธ์ดังกล่าวพบว่าสามารถจัดขวางได้เพียงบางส่วนเท่านั้นเช่นเดียวกับโปรตีน VP37 ดังนั้นอาจจะเป็นไปได้ว่าไวรัสตัวแดงดวงขาวอาจจะใช้โปรตีนห่อหุ้มหลายชนิดในการบุกรุกเข้าสู่เซลล์กิ้ง และอาจจะมีการทำงานร่วมกันระหว่างโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาว ซึ่งในปี 2009 Qing-Hui Lui และคณะทำการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับโปรตีนอื่นของไวรัสตัวแดงดวงขาว พบว่าโปรตีน VP37 สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน VP28 และ VP26 ได้ (53) ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยเรียกการเชื่อมต่อกันของโปรตีนนี้ว่า infectome โดยในปี 2010 โดย Yun-Shiang Chang และคณะทำการทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาว รวมถึงจำลองโครงสร้างสามมิติของการยึดเกาะระหว่างโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาวแสดงในรูปที่ 2.9 (54) ต่อมาในปี 2014 โดย Po-Yu Huang และคณะทำการศึกษาเพิ่มเติมและทำการแบ่งกลุ่มการจัดเรียงตัวของ infectome ออกเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มที่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ Chitin ได้ ซึ่งจะประกอบไปด้วยโปรตีน VP24, VP31, VP32, VP39B และ VP56 และกลุ่มที่ไม่ได้ใช้ Chitin เป็นโมเลกุลตัวรับได้แก่โปรตีน VP51A, VP26, VP28, VP38A และ WSV010 (55) ดังแสดงในรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.9 แบบจำลองโครงสร้างสามมิติและการจัดเรียงโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาว (54)

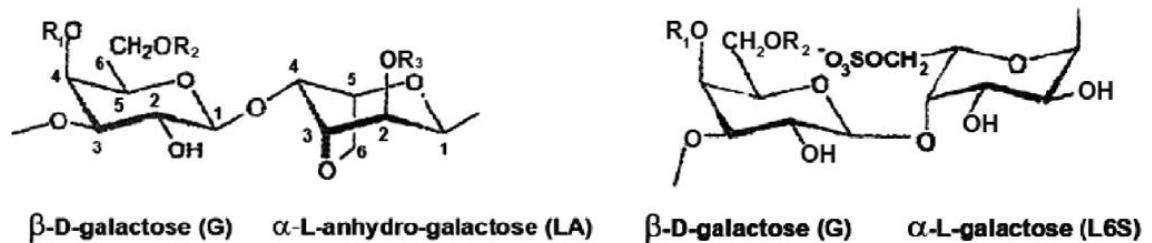


รูปที่ 2.10 การจัดเรียงตัวโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาว (A) การจัดเรียงตัวของโปรตีนแบ่งตามความสามารถในการเกิดปฏิสัมพันธ์กับ Chitin (B) ภาพจำลองโครงสร้างสามมิติในการจัดเรียงตัวโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาว (55)

2.3 สารสกัดจากธรรมชาติต่อต้านการป้องกันการติดเชื้อ

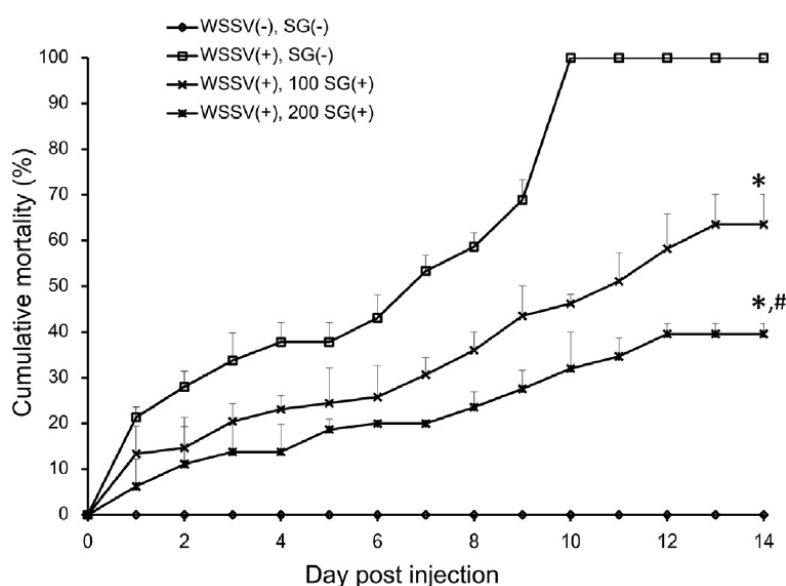
สารสกัดจากธรรมชาติมีคุณสมบัติเป็น sulfated polysaccharides (SPs) ได้แก่ Fucoidans และ Sulfated galactans ซึ่งเป็นสารสกัดที่มีความสำคัญเนื่องจากมีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความหลากหลาย เช่น ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) สารต่อต้านมะเร็ง (anticancer) สารยับยั้งกระบวนการอักเสบ (anti-inflammatory) และสารป้องกันการติดเชื้อไวรัส (antiviral) เป็นต้น ซึ่งสาร SPs สามารถพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ โดยสามารถพบได้ทั้งในคน สัตว์ และพืช แต่จะพบได้มากในสาหร่ายทะเลเช่น fucoidan, carageenans และ sulfated galactans โดยโครงสร้างของ SPs ส่วนใหญ่จะประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลและหมู่ซัลเฟตซึ่งเป็นสารสำคัญต่อกระบวนการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (56) ในปัจจุบันมีการนำสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้ประโยชน์ในด้านการเป็นสารป้องกันการติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียอย่างแพร่หลายทั้งในคน และสัตว์ (57) ยกตัวอย่างเช่นสารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล Fucoidans ที่ได้จาก *Sargassum hemiphyllum* var. *chinense* ที่มีความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อ *Vibrio alginolyticus* ในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) (58) *Sargassum wightii* ที่มีความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อ White spot syndrome virus (WSSV) ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) (59) *Undaria pinnatifida* สามารถป้องกันการติดเชื้อ Herpes simplex virus (60) และ *Sargassum polycystum* ที่มีความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อได้ทั้งแบคทีเรียและไวรัสในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) (61) และนอกจากนี้ยังมีสารสกัดที่ได้จากสาหร่ายสีแดงที่มีคุณสมบัติในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียได้เช่นกัน ยกตัวอย่างเช่น sulfated galactans ที่ได้จาก *Gracilaria tenuistipitata* ที่มีความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อ *Vibrio alginolyticus* (62) *Gracilaria corticata* ที่มีความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อ Herpes simplex virus type 1 และ 2 (63) และในปี 2013 โดย

Kanokpan Wongprasert และคณะ ได้ทำการศึกษาสารสกัด Sulfated galactans จากสาหร่ายสีแดง (*Gracilaria fisheri*) ในการต่อต้านการติดเชื้อ White spot syndrome virus (WSSV) ในกุ้งซึ่งจากการศึกษาพบว่า Sulfated galactans ที่สกัดได้มีส่วนประกอบของ Sulfate อยู่ประมาณ 12.7 % ซึ่งมากกว่าสาหร่ายสีแดงสปีชีส์อื่น ส่วนประกอบคาร์โบไฮเดรตประมาณ 42.2 % และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 100 kDa และนอกจากนี้เมื่อทำการวิเคราะห์โครงสร้างของ Sulfated galactans ด้วยเทคนิค NMR และ FT-IR spectroscopy พบว่าสายหลักของ Sulfated galactans คือ 3-linked β -D-galactopyranose และ 4-linked 3,6-anhydrogalactose และมีบางบริเวณที่เป็น 6-O-methylate- β -D-galactopyranose ที่มีซัลเฟตอยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของ D-galactopyranose และคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ของ L-galactopyranose ดังแสดงในรูปที่ 2.11



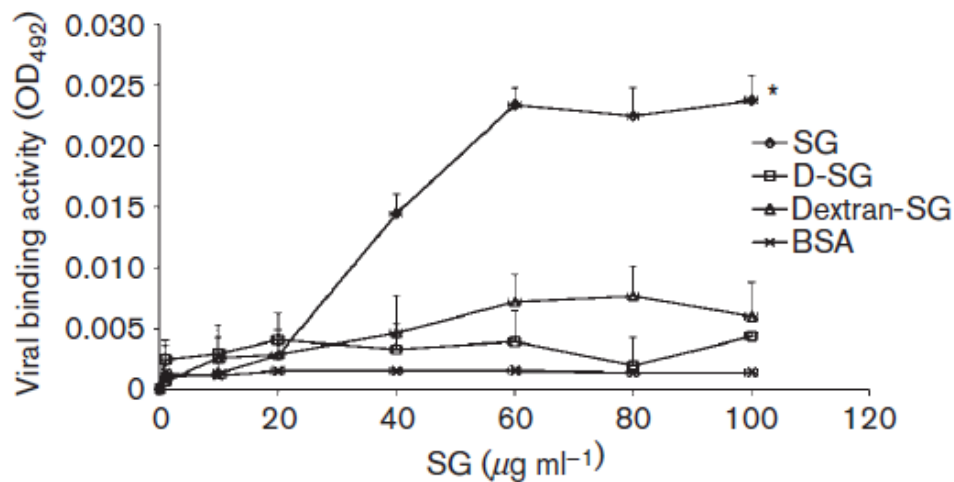
รูปที่ 2.11 โครงสร้าง Sulfated galactans ที่สกัดจากสาหร่ายสีแดง (*Gracilaria fisheri*) โดย R1 คือ H, SO_3^- , R2 คือ H, SO_3^- , CH_3 , L4M และ R3 คือ H, CH_3 (16)

และเมื่อทำการทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อ White spot syndrome virus (WSSV) โดยทำการเลี้ยง artemia ในน้ำที่มี sulfated galactans ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ แล้วนำ artemia ที่ได้ไปเป็นอาหารให้กุ้งก่อนทำการฉีด White spot syndrome virus (WSSV) จากการทดลองพบว่ากุ้งที่ได้รับ Sulfated galactans นั้นมีอัตราการอยู่รอดที่สูงกว่ากุ้งที่ไม่ได้รับ Sulfated galactans และเมื่อทำการเปรียบเทียบในกลุ่มของกุ้งที่ได้รับ Sulfated galactans พบว่ากุ้งที่ได้รับ SG ที่ความเข้มข้นสูงกว่าจะมีอัตราการอยู่รอดที่มากกว่า (รูปที่ 2.12) ดังนั้นจากงานวิจัยนี้จึงบ่งชี้ได้ว่า Sulfated galactans ที่สกัดจากสาหร่ายสีแดง (*Gracilaria fisheri*) นั้นมีความสามารถในการต่อต้านไวรัสตัวแดงดวงขาวในการบุกรุกเข้าสู่กุ้งได้ (15)



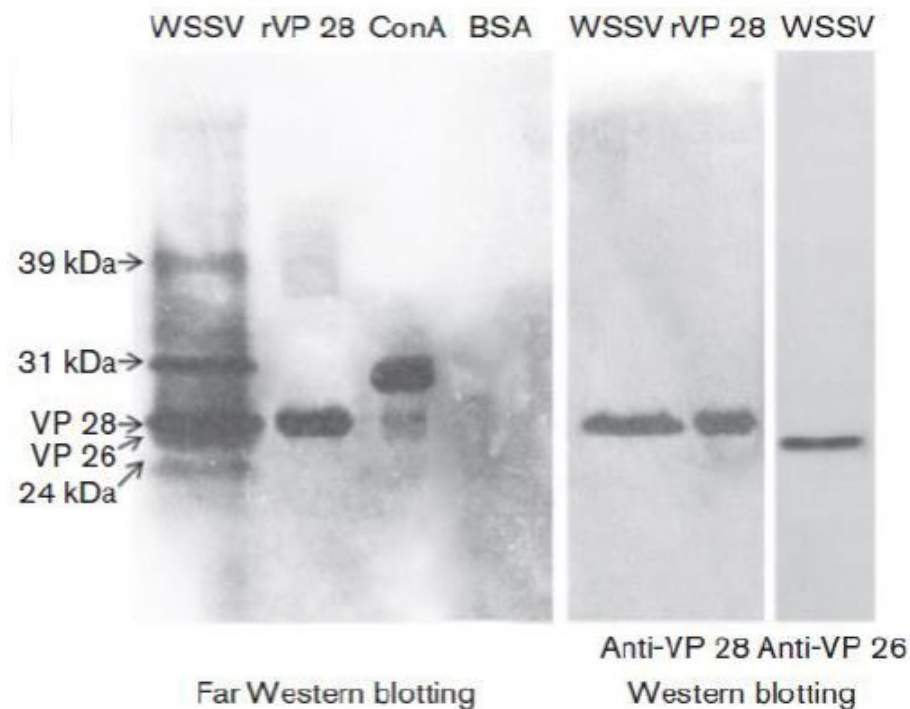
รูปที่ 2.12 อัตราการอยู่รอดของกุ้งเมื่อได้รับ Sulfated galactans ที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วทำการฉีดด้วย White spot syndrome virus (16)

ในปีต่อมานักวิจัยกลุ่มเดิมจึงสนใจที่จะศึกษาถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างไวรัสตัวแดงดวงขาวกับ Sulfated galactans ที่สกัดได้จากสาหร่ายสีแดง (*Gracilaria fisheri*) เนื่องจาก Sulfated galactans เป็นสารที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Sulfated polysaccharide ซึ่งจะมีส่วนประกอบของ Sulfated group อยู่มาก ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงทำการศึกษาถึงความสำคัญของ Sulfate group ต่อการเกิดปฏิสัมพันธ์กับไวรัสตัวแดงดวงขาว ซึ่งจากการศึกษาด้วยเทคนิค Solid-phase viral binding assay พบว่า Sulfated group ของ Sulfated galactans นั้นมีส่วนสำคัญต่อการจับกับไวรัสตัวแดงดวงขาว เนื่องจากเมื่อทำการกำจัดหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ Sulfated galactans (D-sulfated galactans และ Dextran-Sulfated galactans) ส่งผลให้ความสามารถในการจับกับไวรัสตัวแดงดวงขาวลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับ Sulfated galactans ปกติดังแสดงในรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.13 การศึกษาความสำคัญของหมู่ซัลเฟตต่อการจับของไวรัสตัวแดงดวงขาว (17)

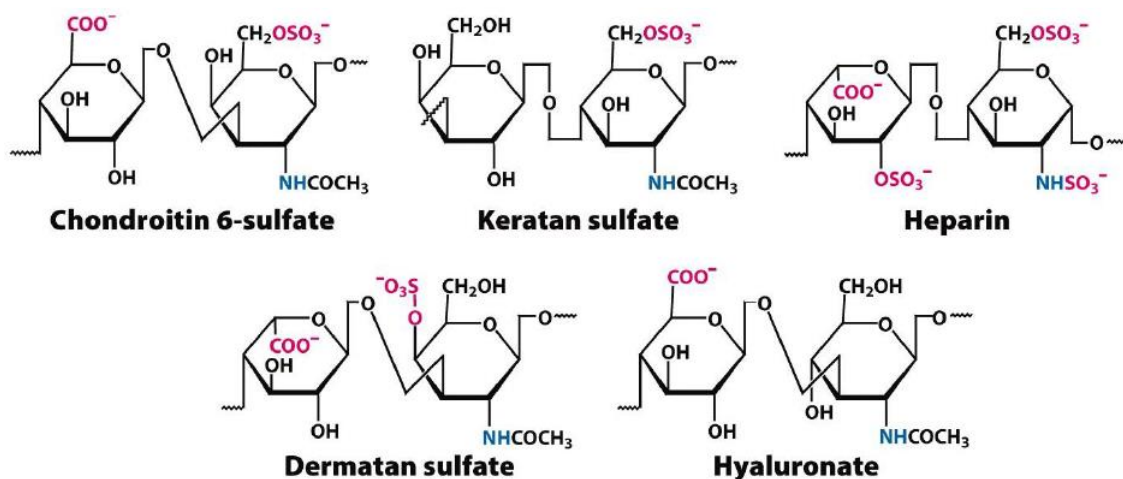
ดังนั้นเมื่อทราบแล้วว่าส่วนที่เป็น Sulfated group ของ Sulfated galactans มีความสำคัญต่อการจับกับไวรัสตัวแดงดวงขาว จึงทำการศึกษาในระดับ *In vitro assay* ถึงลักษณะ cytopathic effect (CPE) ที่เกิดขึ้น โดยการบ่ม WSSV กับ Sulfated galactans ก่อนนำไปบ่มกับเม็ดเลือดกึ่งเทียบกับ WSSV ที่ไม่ได้ทำการบ่มกับ Sulfated galactans พบว่าเม็ดเลือดกึ่งมีลักษณะของ Cytopathic effect ที่ต่างกัน ซึ่งแสดงให้เห็นได้ว่า Sulfated galactans มีความสามารถในการลดการเกิด Cytopathic effect ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงทำการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาวกับ Sulfated galactans ด้วยเทคนิค Far-Western blot โดยทำการติดตามด้วย anti-LM5 (IgG specific (1,4)-beta-galactan) ที่จำเพาะกับ Sulfated galactans ซึ่งจากการทดลองพบว่าพบแบนโปรตีนที่ขนาด 24, 26, 28, 31 และ 39 kDa ตามลำดับ แต่เป็นที่ทราบกันดีว่าโปรตีนขนาด 26 และ 28 kDa เป็นโปรตีนห่อหุ้ม VP26 และ VP28 ตามลำดับ และเพื่อเป็นการยืนยันจึงทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค Western blot ที่ติดตามด้วย anti-VP26 และ anti-VP28 จากการตรวจสอบพบว่าพบแบนโปรตีน VP26 และ VP28 อยู่ตำแหน่งเดียวกับโปรตีนที่จับกับ Sulfated galactans ดังนั้นจึงบ่งชี้ได้ว่า Sulfated galactans สามารถจับกับโปรตีน VP26 และ VP28 (16) ดังแสดงในรูปที่ 2.14



รูปที่ 2.14 ผลการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาวกับ Sulfated galactans ด้วยเทคนิค Far-Western blot (16)

2.4 ไกลโคซามิโนไกลแคนต่อบทบาทการเป็นโมเลกุลตัวรับ

ไกลโคซามิโนไกลแคน (Glycosaminoglycans, GAGs) เป็นเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (Heteropolysaccharide) ที่พบมากในร่างกาย โดยมีลักษณะเป็นพอลิแซ็กคาไรด์สายยาวไม่แตกแขนง และมีบริเวณที่เป็นตำแหน่งในการเชื่อมต่อกับโปรตีนไกลแคน (Proteoglycans) โดยโครงสร้างของไกลโคซามิโนไกลแคนประกอบด้วย ไดแซ็กคาไรด์ (Disaccharide) 2 โมเลกุลคือ N-acetylgalactosamine (GalNAc) หรือ N-acetylglucosamine (GlcNAc) และ uronic acid เช่น glucuronate (GlcA) หรือ iduronate ซ้ำๆ กัน โดยไกลโคซามิโนไกลแคนจะมีความเป็นประจุลบสูงเนื่องจากมีส่วนประกอบของ hydroxyl, carboxyl และ sulfate groups อยู่เป็นจำนวนมาก ไกลโคซามิโนไกลแคนสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มได้ 6 กลุ่มได้แก่ Heparin/Heparan sulfate, Chondroitin sulfate, Keratan sulfate, Dermatan sulfate และ Hyaluronic acid ดังแสดงในรูปที่ 2.15 ซึ่งไกลโคซามิโนไกลแคนทุกกลุ่มจะมีหมู่ซัลเฟตเป็นส่วนประกอบที่สำคัญ ยกเว้น Hyaluronic acid เพียงชนิดเดียวที่ไม่มีหมู่ซัลเฟต และไกลโคซามิโนไกลแคนสามารถสร้างพันธะโควาเลนต์เชื่อมต่อกับโปรตีนได้โดยเรียกว่า โปรตีนไกลแคน (proteoglycans) (64)



รูปที่ 2.15 ชนิดของไกลโคซามิโนไกลแคน (Glycosaminoglycans) (64)

ไกลโคซามิโนไกลแคนสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิดสามารถพบได้ที่บริเวณผิวเซลล์และ extracellular matrix โดยจะทำหน้าที่เหมือน co-receptor ที่ช่วยให้เซลล์ตอบโต้ secreted signal proteins (64-66) นอกจากนี้ยังสามารถพบไกลโคซามิโนไกลแคนได้ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ผิวหนัง กระดูกอ่อน เยื่อฐาน (basement) ผิวเซลล์ และช่องว่างระหว่างเซลล์ (67) จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าไกลโคซามิโนไกลแคนเกี่ยวข้องกับการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของไวรัสหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น Dengue virus and Yellow Fever Virus (18), Rift Valley Fever virus (19), Herpes Simplex Virus (68), และ Hepatitis C virus (69) เป็นต้น

จากการทดลองของ Kanokpan และคณะบ่งชี้ว่าสารสกัด Sulfated galactans ที่ได้จากสาหร่ายสีแดง (*Gracilaria fisheri*) นั้นมีความสามารถในการขัดขวางการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ โดยจะทำการออกฤทธิ์ที่ตัวไวรัสโดยตรง ส่งผลให้ผู้วิจัยเกิดสมมติฐานว่าหาก Sulfated galactans นั้นสามารถที่จะขัดขวางการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของไวรัสได้ บ่งชี้ได้ว่า Sulfated galactans น่าจะขัดขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนห่อหุ้มเซลล์ของไวรัสที่สำคัญกับโมเลกุลบนผิวเซลล์กึ่ง ดังนั้นบนผิวเซลล์กึ่งอาจจะมีโมเลกุลที่มีคุณสมบัติคล้ายกับ Sulfated galactans (Sulfated galactans-like molecule) ซึ่งในปี 2008 ได้มีการรายงานการค้นพบ heparin-like glycosaminoglycans ในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) (20) และปี 2011 พบ Heparan sulfated ในกุ้งแช่บ๊วย (*Penaeus brasiliensis*) (21) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าไวรัสตัวแดงดวงขาวอาจจะใช้โปรตีนห่อหุ้มที่สำคัญจับกับ SG-like molecule เพื่อบุกรุกเข้าสู่เซลล์ดังนั้นในงานวิจัยชิ้นนี้จึงสนใจทำการทดสอบความสามารถในการขัดขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งด้วย sulfated galactans รวมถึงการหาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ Heparin เพื่อตรวจสอบสมมติฐานที่ว่า Sulfated galactans เข้าไปออกฤทธิ์ระหว่างโปรตีนห่อหุ้มของไวรัสตัวแดงดวงขาวกับ SG-like molecule

บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 เครื่องมือ

Autoclave (TOMY, SX-700)

Cylinder

Disposable pipette 10 ml

Gel electrophoresis (BIO-RAD, sub-cell GT mini)

Hot air oven (BINDER, FED400)

Lamina flow (36211 -04; Labconco)

Microcentrifuge (HETTICH ZENTRIFUGEN, Mikro 200R)

Micropipette 0.5 – 10 μ l (AV – 100; Accumax)

Micropipette 100 – 1000 μ l (AV – 600; Accumax)

Micropipette 20 – 200 μ l (AV – 800; Accumax)

Microtube 1.5 μ l

Microwave (R – 3S68; sharp)

Orbital shaker (4581; Thermo forma)

Petri dish (K1004; Hycon)

pH meter (713 pH meter; Metrohm)

Pipette tip of Micropipette 100 – 1000 μ l (Greiner labotechnik)

Pipette tip of Micropipette 0.5 – 10 μ l (Corning)

Pipette tip of Micropipette 20 – 200 μ l (Corning)

Power supply (Power pac 200; Bio-RAD)

Refrigerator (SJ-D48H-BE; sharp)

Refrigerator & Freeze -20 °C (FC-19; sharp)

SDS-PAGE (BIO-RAD, Mini-protein II cell)

Spreader

Sonicator (SONIC & Material, VEX600)

Vortex mixer (vortex-2-genie G560E; Scientific industries)

Water bath (WB-14; Memmert)

3.1.2 สารเคมีและเอนไซม์

Acrylamide (OMEGA)

Ammonium persulfate (SIGMA)

Ampiciliin

Bis acrylamide (OMEGA)

100X Bovine serum albumin (BSA) (BIO-LAB)

Coomassie blue (CARLO ERBA REAGENT)

Ethanol

Gracial acetic acid (OREC)

Glycerol

Glycine

High Speed Plasmid Mini Kit (GENEAID)

Hydrochloric acid (HCl) (BDH)

Isopropyl- α -Dthiogalactopyranoside (IPTG)

Mercaptoethanol

Methanol

Nikle resin bead (Ni-NTA resin bead) (QIAGEN)

Protein molecular weight standard (BIO-RAD)

Sodium dodecyl sulfate (SDS) (AJAX FEHECHEM)

Sodium hydroxide (NaOH) (CARLO ERBA REAGENT)

Tetramethylethylenediamine (TEMED) (SIGMA)

Trise-base (PROMEGA)

Tryptone

Yeast extract (SPRINGER)

TMB substrate

3.1.3 เชื้อแบคทีเรีย และพลาสมิด

Recobinant plamid VP37 (pTAT-VP37)

แบคทีเรีย *Escherichia coli* strain BL21

แบคทีเรีย *Escherichia coli* strain DH5 α

แบคทีเรีย *Escherichia coli* strain RIL ที่มี Recombinant plasmid TEV protease (pRK 793-TEV)

3.2 วิธีการทดลองการศึกษาบทบาทหน้าที่และการตกผลึกโปรตีน VP37

3.2.1 การสร้างพลาสมิดลูกผสม pET-15b(+)-Thio-VP37 สำหรับใช้ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน VP37 ในระบบ *E. coli*

การเพิ่มจำนวนชิ้น VP37 ด้วยวิธี PCR ทำได้โดยใช้ total genome ของไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นดีเอ็นเอต้นแบบที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย (template) สำหรับการเพิ่มจำนวนชิ้น VP37 ซึ่งผู้วิจัยได้รับความอนุเคราะห์ total genome ของไวรัสตัวแดงดวงขาว จากศูนย์วิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพทุ่ง สำหรับ primer ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้น VP37 ออกแบบมาจากการตรวจสอบลำดับเบสของ VP37 ในฐานข้อมูล NCBI (GenBank accession No. AF411634) ทำการผสมสารเคมีสำหรับจะนำไปทำ PCR ดังต่อไปนี้

Component	volume/reaction
Molecular water	19.5 μ l
10X PCR buffer	2.5 μ l
dNTP	0.5 μ l
F-primer	0.5 μ l
R-primer	0.5 μ l
Template	1.0 μ l
<i>Taq</i>	0.5 μ l
Total volume	25.0 μ l

ใส่หลอดทดลองสำหรับทำ PCR ที่ผสมสารเคมีเรียบร้อยแล้วลงในเครื่อง PCR โดยตั้งโปรแกรมปฏิกิริยา PCR ดังต่อไปนี้

Temperature	Time	Cycle
95°C	5 min	1
95°C	30 sec	} 25
55°C	30 sec	
72°C	1 min	
72°C	5 min	1
16°C	∞	-

ตรวจสอบขนาดของชิ้นยีนที่ได้จากการทำ PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ที่มีความเข้มข้นของ agarose gel เท่ากับ 1.0 % ใน TBE buffer โดยเทียบขนาดของยีน VP37 กับดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน

จากนั้นนำชิ้นยีน *VP37* ที่ได้มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการตัดชิ้นยีน *VP37* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยวิธี agarose gel electrophoresis หลังจากจากนั้นทำบริสุทธิ์ชิ้นยีน *VP37* ด้วยชุด Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit ตรวจสอบคุณภาพและดูความบริสุทธิ์ชิ้นยีน *VP37* ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis อีกครั้ง

3.2.1.1 การเตรียมพลาสมิด pET-15b(+)-Thio

เพิ่มปริมาณพลาสมิด pET-15b(+)-Thio ด้วยการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL1-Blue ด้วยวิธี transformation ที่อุณหภูมิ 42°C จากนั้นนำโคโลนีของเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดมาทำการเพิ่มจำนวนในอาหาร LB broth ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 100 เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ทำการสกัดพลาสมิดออกจากเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* โดยใช้ High speed plasmid mini Kit จากนั้นทำการตัดพลาสมิด pET-15b(+)-Thio ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการตัดพลาสมิด pET-15b(+)-Thio ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis เทียบกับ พลาสมิดที่ไม่ได้ทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ทำพลาสมิดให้บริสุทธิ์ด้วย Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit จากนั้น Kit ตรวจสอบคุณภาพและดูความบริสุทธิ์ชิ้นพลาสมิด pET-15b(+)-Thio ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis อีกครั้ง

3.2.1.2 การเชื่อมพลาสมิดและชิ้นยีนเพื่อสร้างสร้างพลาสมิดลูกผสม

ยีน *VP37* และพลาสมิด pET-15b(+)-Thio ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเรียบร้อยแล้ว นำมาทำการเชื่อมชิ้นส่วนของยีน *VP37* กับพลาสมิด pET-15b(+)-Thio เข้าด้วยกันโดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกพลาสมิดลูกผสม pET-15b-Thio(+)-*VP37* ที่ทำการเชื่อมสำเร็จด้วยวิธี transformation เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL1-Blue โดยคัดเลือกโคโลนีของเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ที่สามารถเจริญได้บนอาหารแข็ง LB agar ที่มียา Ampicillin ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml

3.2.1.3 การคัดเลือกเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม pET-15b(+)-Thio-*VP37* ด้วยวิธี colony PCR และ plasmid PCR

ทำการคัดเลือกโคโลนีที่เจริญอยู่บนอาหารแข็ง LB agar จากการทดลองก่อนหน้านี้มาทำการตรวจสอบโคโลนี *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม pET-15b(+)-Thio-*VP37* ด้วยวิธี colony PCR เพื่อตรวจหาชิ้นยีน *VP37* โดยใช้ primers คู่เดิมกับที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นยีน *VP37* และใช้โคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่เจริญบนอาหารแข็ง LB agar เป็น template สำหรับการตรวจสอบชิ้นยีน *VP37* ขณะเดียวกันก็ทำ master plate โดยใช้โคโลนีที่ใช้เป็น template เหล่านั้นเขียนลงบนอาหารแข็ง LB agar ที่มียาปฏิชีวนะ

ampicillin ความเข้มข้น 100 µg/ml หลังการทำ colony PCR เรียบร้อยนำตัวอย่างที่ได้มาตรวจสอบผลการคัดเลือกโคโลนีที่มีขึ้นยืน *VP37* ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

จากนั้นนำโคโลนีที่ให้ผลบวกมาทำการเพิ่มปริมาณพลาสมิดลูกผสม pET-15b(+)-Thio-*VP37* ด้วยการนำเชื้อ *E. coli* จาก master plate มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB broth ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 100 µg/ml เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดลูกผสมออกจากเชื้อ *E. coli* ด้วย High Speed Plasmid Mini Kit ทำการยืนยันว่าพลาสมิดที่สกัดมาได้จากโคโลนีที่ให้ผลบวกมีขึ้นยืน *VP37* อยู่หรือไม่ ด้วยเทคนิค plasmid PCR ซึ่งในการทดลองจะใช้เทคนิคเช่นเดียวกับการทำ colony PCR แต่จะใช้ template คือพลาสมิดลูกผสม pET-15b(+)-Thio-*VP37* ที่สกัดได้ในการทดลองนี้ นำตัวอย่างที่ได้จากการทำ PCR มาตรวจสอบผลการคัดเลือกพลาสมิดลูกผสมที่มีขึ้นยืน *VP37* ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

3.2.1.4 การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *VP37* บนพลาสมิดลูกผสม pET-15b(+)-Thio-*VP37*

จากนั้นเพื่อยืนยันความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *VP37* ที่สร้างเป็นพลาสมิดลูกผสม pET-15b(+)-Thio-*VP37* สำเร็จ จึงนำพลาสมิดลูกผสม pET-15b(+)-Thio-*VP37* จากโคโลนีที่แตกต่างกัน 3 โคโลนี ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค Nucleotide sequencing เมื่อทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ Nucleotide sequencing นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบ (alignment) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *VP37* จากฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม ClustalX version 1.81 [98] และทำการแปลรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน *VP37* โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ ExPASy - Translate tool [99] และทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้โดยใช้โปรแกรม ClustalX version 1.81 เพื่อตรวจสอบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนลูกผสม *VP37* เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนที่ถูกต้อง

3.2.2 การศึกษาการแสดงออกของโปรตีน *VP37* ในระบบเซลล์แบคทีเรีย *E. coli*

3.2.2.1 การถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสม pET-15b(+)-Thio-*VP37* เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ในสายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่แตกต่างกัน

การถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสม pET-15b(+)-Thio-*VP37* เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* จะใช้เทคนิค transformation โดยการนำพลาสมิดลูกผสม pET-15b(+)-Thio-*VP37* ปริมาตร 2 µl ใส่ลงไปในหลอดทดลองที่มีเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ที่อยู่ในสภาพพร้อมที่จะรับดีเอ็นเอภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ (competent cell) จากสายพันธุ์ BL21(DE3), BL21CodonPlus(DE3)-RIL, Origami และ Rosetta

จากนั้นนำไปบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ทำการ heat shock โดยบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 60 วินาที ต่อจากนั้นเติมอาหารเหลว LB broth ลงในหลอดทดลอง ปริมาตร 500 μ l นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการคัดเลือกเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม pET-15b-Thio-VP3 โดยการตกตะกอนเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 g เป็นเวลา 1 นาที แล้วทำการละลายตะกอนเซลล์กลับขึ้นมาในปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 μ l จากนั้นนำไป spread ลงบนอาหารแข็ง LB agar มียาปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 100 μ g/ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

3.2.2.2 การเหนี่ยวนำให้เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม pET-15b(+)-Thio-VP3 ผลิตโปรตีน VP37

เชื้อโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21, BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, Origami และ Rosetta ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม pET-15b(+)-Thio-VP3 ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB broth ปริมาตรหลอดละ 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเซลล์ตั้งต้น จากนั้นถ่ายเซลล์ตั้งต้นที่ได้ปริมาตร 500 μ l (อัตราส่วน 1:100) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB broth ที่เติมยาปฏิชีวนะที่จำเพาะกับแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* (BL21: ampicillin ความเข้มข้น 100 μ g/ml, BL21-CodonPlus(DE3)-RIL และ Rosetta: ampicillin ความเข้มข้น 100 μ g/ml และ chloramphenicol ความเข้มข้น 30 μ g/ml, Origami: ampicillin ความเข้มข้น 100 μ g/ml และ kanamycin ความเข้มข้น 50 μ g/ml) ปริมาตร 50 ml จำนวน 2 flask ต่อหนึ่งสายพันธุ์ แล้วนำไปเขย่า ความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง หรือเมื่อนาเซลล์แบคทีเรียไปวัดค่าความดูดกลืนคลื่นแสงที่ 600 nm จะต้องมียาค่าประมาณ 0.6 ทำการเหนี่ยวนำให้เซลล์แบคทีเรียเกิดการผลิตโปรตีนให้มากขึ้นด้วย Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ความเข้มข้น 0.5 mM จากนั้นนำไปเขย่าต่อที่อุณหภูมิ 20°C ที่ความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำการเก็บตะกอนเซลล์โดยนำไปปั่นตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเมื่อเลี้ยงเซลล์ที่เหลือจนครบ 16 ชั่วโมง จึงทำการเก็บตะกอนเซลล์เพื่อนำไปตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน VP37 ต่อไป

3.2.2.3 การทำบริสุทธิ์โปรตีน VP37 ในระดับย่อยของทดสอบการแสดงออกโปรตีนของโปรตีน VP37

นำตะกอนเซลล์ที่ได้หลังจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตโปรตีนมาละลายด้วย lysis buffer (20 mM Tris-base pH8, 0.3 M NaCl, 15 mM Imidazole และ 0.5% TritonX 100) ปริมาตร 35 ml จากนั้นทำการสกัดโปรตีนออกจากเซลล์แบคทีเรียด้วยเทคนิคที่ใช้คลื่นเสียง โดยใช้เครื่อง sonicator (Amplitude 40) ทำการแยกโปรตีนส่วนใสออกจากตะกอนเซลล์แบคทีเรีย โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 20,000 g เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อเป็นการตรวจสอบว่าโปรตีน VP37 อยู่ในรูปของโปรตีนที่ไม่

ละลายน้ำ (Inclusion bodies) หรือไม่ จะทำการเก็บตะกอนเซลล์ใส่ในหลอดทดลอง แล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วย lysis buffer ปริมาตรประมาณ 50 μ l สำหรับการตรวจสอบว่าโปรตีน VP37 อยู่ในรูปของโปรตีนที่ละลายน้ำ (soluble protein) หรือไม่ จะทำการแยกเอาโปรตีนส่วนใสใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 50 ml จากนั้นเติม Ni-NTA bead ปริมาตร 100 μ l แล้วบ่มในที่เย็นเป็นเวลา 30 นาที (พลิกหลอดไปมาช้าๆ ทุกๆ 3 นาที) ปลอຍให้ Ni-NTA bead ตกตะกอนลงมาที่ก้นหลอด แล้วใช้ปิเปตดูดเอา Ni-NTA bead ขึ้นมาใส่ลงใน eppendorff นำ Ni-NTA bead ที่ได้มาล้างด้วย lysis buffer ปริมาตร 1.5 ml แล้วนำไปปั่นตกตะกอนน้ำ Ni-NTA bead ที่ความเร็วรอบ 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นทิ้งส่วนใส ทำการล้างทั้งหมด 5 รอบ สำหรับรอบสุดท้ายดูดส่วนใสออกให้เหลือปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 μ l เติม 6X reducing loading Dye และนำไปอังไอน้ำที่ความร้อน 100°C เป็นเวลา 1 นาที สำหรับที่จะนำไปตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

3.2.2.4 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

นำตัวอย่างโปรตีนในส่วนที่จับกับ Ni-NTA bead และส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์หลังจากทำให้เซลล์แตกมาทำการโหลดลงในแผ่นเจล 15% SDS-PAGE เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน VP37 โดยใช้กระแสไฟฟ้าเท่ากับ 150 Volt เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นเจลมาย้อมด้วยสี Coomassie stain (Coomassie Brilliant Blue R250 1 g, Glacial acetic acid 100 ml, methanol 400 ml และ DDW 500 ml) และล้างด้วยแผ่นเจลด้วย De-stain (methanol 200 ml, Glacial acetic acid 100 ml และ DDW 700 ml) จะเห็นแผ่นเจลมีลักษณะใส และปรากฏแถบของโปรตีนชัดเจน ทำการวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนตัวอย่างเทียบกับขนาดของโปรตีนมาตรฐาน (Protein marker)

3.2.3 การทำบริสุทธิ์โปรตีน VP37 ด้วยเทคนิค Ni-NTA affinity chromatography และการกำจัดส่วนที่เป็นโปรตีน fusion tag ออกจากโปรตีน VP37

3.2.3.1 การทำบริสุทธิ์โปรตีน VP37 ด้วยเทคนิค Ni-NTA affinity chromatography

จากการทดลองก่อนหน้านี้จะทำให้ทราบถึงสถานะที่ดีที่สุดที่ใช้ในการแสดงออกโปรตีน VP37 จึงใช้สถานะนี้ในการผลิตโปรตีน โดยใช้ปริมาตรอาหารเหลว LB broth 1 ลิตร โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิดลูกผสม pET-15b(+)-Thio-VP3 จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์หลังจากเหี่ยวน้ำให้ผลิตโปรตีนเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย lysis buffer ปริมาตร 70 ml จากนั้นทำการสกัดโปรตีนออกจากเซลล์แบคทีเรียด้วยเทคนิคที่ใช้คลื่นเสียงโดยใช้เครื่อง sonicator (Amplitude 40) ทำการแยกโปรตีนส่วนใสออกจากตะกอนเซลล์แบคทีเรีย โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 20,000 g เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นนำโปรตีนส่วนใสไปเทใส่ในคอลัมน์

ทำบริสุทธิ์โปรตีน Econo column (Bio-Rad) ที่มี Ni-NTA bead ปริมาตร 1 ml แล้วบ่มให้ Ni-NTA bead จับกับโปรตีนในที่เย็นเป็นเวลา 30 นาที (พลิกคอลัมน์ไปมาช้าๆ ทุกๆ 5 นาที) จากนั้นล้างด้วย lysis buffer และ wash buffer (20 mM Tris-base, 0.5 M NaCl และ 15 mM Imidazole , pH 8) ปริมาตร อย่างละ 500 ml จากนั้นทำการชะโปรตีนออกจาก Ni-NTA bead โดยใช้ elution buffer (20 mM Tris-base, 150 mM NaCl และ 0.2 M Imidazole , pH 8) ปริมาตร 5 ml ทั้งหมด 5 ครั้ง นำโปรตีนที่ได้ไปทำการตรวจสอบขนาดและคุณภาพของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE จากนั้นนำโปรตีนมารวมกันและทำการเปลี่ยนบัฟเฟอร์เป็น TEV cleavage buffer (50mM Tris base pH 8, 150 mM NaCl) ด้วย PD10 column โดยทำการผ่านโปรตีนปริมาตร 2.5 ml ลงในคอลัมน์ และใส่ TEV cleavage buffer pH 8 ปริมาตร 3.5 ml รองรับส่วนที่ไหลออกมา นำโปรตีนที่ได้มารวมกันและนำไปทำการกำจัดส่วนที่เป็น Thioredoxin ออกด้วย TEV protease ต่อไป

3.2.3.2 การกำจัดโปรตีน Thioredoxin ที่เชื่อมอยู่กับโปรตีน VP37 ออกด้วยโปรตีน TEV protease

นำโปรตีน VP37 หลังจากการทำบริสุทธิ์ที่อยู่ใน TEV cleavage buffer มาเติมด้วย 1X Glutathione หรือ Mercapto (ปริมาตรโปรตีนต่อ mercapto เท่ากับ 1000 ml ต่อ 348 μ l) จากนั้นเติม TEV protease (ปริมาตรโปรตีนต่อ TEV protease เท่ากับ 5 ml ต่อ 1 ml) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำการแยกโปรตีนที่ถูกตัดโดยผ่าน Econo column โดยเริ่มจากการล้างคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่นและ TEV cleavage buffer จากนั้นเติม Ni-NTA bead และโปรตีนที่ถูกตัดแล้วลงไป บ่มในที่เย็นเป็นเวลา 30 นาที (พลิกคอลัมน์ไปมาช้าๆ ทุกๆ 5 นาที) จากนั้นนำหลอดทดลองมารองรับโปรตีนที่ถูกตัด Thioredoxin ออกแล้ว และเติม elution buffer เพื่อทำการชะเอาส่วนที่เป็นโปรตีน Thioredoxin และโปรตีน TEV protease ออกมาเพื่อนำไปทำการตรวจสอบว่าโปรตีน TEV protease สามารถตัดโปรตีน VP37 ออกจากโปรตีน Thioredoxin ได้หรือไม่โดยการนำไปตรวจสอบขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

3.2.3.3 การทำบริสุทธิ์โปรตีน VP37 ด้วยเทคนิค Gel filtration

นำโปรตีนที่ได้จากหัวข้อ 3.4.1 และ 3.4.2 ทำให้เข้มข้นจนมีปริมาตรรวม 500 μ l จากนั้นนำไปฉีดผ่านคอลัมน์ DEAE-Hiprep FF 16/10 (10.0 x 1.6 cm. FPLC system, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden) ที่ถูก equilibrate ด้วย PBS buffer แล้วทำการชะโปรตีนด้วยอัตราเร็ว 0.6 ml/min และทำการเก็บโปรตีนโดยเก็บ Fraction ละ 2.0 ml จากนั้นนำแต่ละ Fraction ไปทำการตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และเก็บโปรตีนที่มีขนาด 48 kDa สำหรับโปรตีน VP37 รูปแบบ Full length และ 34 kDa สำหรับโปรตีน VP37 รูปแบบ C-terminal domain แล้วทำให้เข้มข้นด้วยการนำไป concentrate (Macrosep® Advance Centrifugal Devices) โดยปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 g อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที จนกว่าจะได้ความเข้มข้นมากกว่า 1 mg/ml และทำการเก็บโปรตีนที่ -80 °C

3.2.4 การทดสอบหน้าที่ของโปรตีน VP37 ในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง

3.2.4.1 การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง (shrimp hemocyte)

ทำการดูดเซลล์เม็ดเลือดกุ้งด้วยเข็มฉีดยาที่มี salt solution ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นทำการนับเซลล์เม็ดเลือดกุ้งและเจือจางเซลล์เม็ดเลือดกุ้งด้วยอาหาร 2XL15 + antibiotic ให้ได้ปริมาณเซลล์ 2×10^6 cells นำเซลล์เม็ดเลือดกุ้งที่ได้ไปทำการเพาะเลี้ยงใน 96 wells plate โดยใส่เซลล์เม็ดเลือดกุ้ง 100 μ l/well ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 27°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการเปลี่ยนอาหารใหม่เพื่อกำจัดเซลล์ที่ไม่เกาะกับ plate ออก โดยใช้ 2XL15 + antibiotic ปริมาตร 100 μ l แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 27°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3.2.4.2 การทดสอบการจับกันระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกุ้งด้วยเทคนิค ELISA

เซลล์เม็ดเลือดกุ้งที่ได้นำไปทำการ block ด้วย 5% BSA ที่ละลายอยู่ในอาหาร 2XL15 เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นล้าง 3 ครั้งด้วยอาหาร 2XL15 เนื่องจากจะต้องทำการตรวจสอบโปรตีน VP37 จาก 6x His tag จึงต้องเติมโปรตีน VP37 ที่ไม่ได้กำจัดโปรตีน Thioredoxin ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.05, 0.2, และ 0.5 mg/ml ปริมาตร 100 μ l ลงไปใน well ที่มีเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง บ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ล้าง 3 ครั้งด้วยอาหาร 2XL15 เติม antibody (Anti-His) 1:4000 ที่ละลายอยู่ในอาหาร 2XL15 ปริมาตร 100 μ l บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้าง 3 ครั้งด้วยอาหาร 2XL15 แล้วใส่ substrate TMB ปริมาตร 100 μ l บ่มในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปวัดค่า OD650 สำหรับการทดลองควบคุมจะทำการทดลองที่กล่าวมาแต่จะไม่มีเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง

3.2.4.3 การทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง ด้วยเทคนิค

Immunocytochemistry

นำเซลล์เม็ดเลือดกุ้งที่ได้จากขั้นตอน 3.2.4.1 มาทำการล้างด้วยอาหารใหม่ ทำการ fix ด้วย 4% paraformaldehyde แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และ treat ด้วย acetone นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำมาล้างด้วย PBS 2 ครั้ง ทำการ block ด้วย 5% BSA หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำ plate มาล้างด้วย PBS ประมาณ 3 ครั้ง แล้วทำการใส่โปรตีน VP37 ลงไปบ่มกับเซลล์เม็ดเลือดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาล้างด้วย PBS 3 ครั้ง บ่มต่อด้วย anti-his antibody ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS ประมาณ 5-6 ครั้ง สุดท้ายเติม TMB substrate ลงไป บ่มเอาไว้ในที่มืด 5 นาที นำมาส่องดูผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยมีโปรตีน Thioredoxin เป็นโปรตีนควบคุม

3.2.5 การศึกษาหาบริเวณบนโมเลกุลโปรตีน VP37 ที่ใช้ในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดกึ่ง

3.2.5.1 การออกแบบชิ้นส่วนต่างๆ ของโปรตีน VP37

สำหรับการออกแบบชิ้นส่วนต่างๆของโปรตีน VP37 จะอ้างอิงจาก secondary structure ของโปรตีน VP37 ซึ่งโปรตีนจากชิ้นส่วนต่างๆของโปรตีน VP37 มีทั้งหมด 4 รูปแบบคือ VP37(111-281), VP37(138-281), VP37(1-265) และ VP37(1-250) โดยที่รูปแบบ VP37 (111-281) จะครอบคลุมกรดอะมิโนลำดับที่ 111-281, รูปแบบ VP37(138-281) จะครอบคลุมกรดอะมิโนลำดับที่ 138-281, รูปแบบ VP37(1-265) จะครอบคลุมกรดอะมิโนลำดับที่ 1-265 และรูปแบบ VP37(1-250) จะครอบคลุมกรดอะมิโนลำดับที่ 1-250

3.2.5.2 การสร้างพลาสมิดลูกผสมของชิ้นส่วนต่างๆ ของโปรตีน VP37 สำหรับใช้ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli*

การสร้างพลาสมิดลูกผสมของชิ้นส่วนต่างๆ ของโปรตีน VP37 จะทำการออกแบบ primer สำหรับทำ PCR (primer แสดงอยู่ในผลการทดลอง) โดยอ้างอิงจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP37 ในฐานข้อมูล NCBI จากนั้นทำการ เพิ่มชิ้นยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้สภาวะเหมือนกับที่ใช้ในการเพิ่มชิ้นยีน VP37 จากนั้นนำ PCR product และพลาสมิด pET-15b(+)-Thio มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I หลังจากทำปฏิกิริยาดังกล่าวด้วยชุด Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit แล้ว นำชิ้นยีนและพลาสมิดมาเชื่อมเข้าด้วยกันด้วยเอนไซม์ ligase นำไป transform ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL1-Blue ที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมด้วยเทคนิค colony PCR และ plasmid PCR จากนั้นยืนยันลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยการส่งวิเคราะห์ sequencing

3.2.5.3 การศึกษาการแสดงออกของชิ้นส่วนต่างๆ ของโปรตีน VP37 ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli*

หลังจากที่ยืนยันผลการสร้างพลาสมิดลูกผสมของชิ้นส่วนต่างๆ ของโปรตีน VP37 ที่ถูกต้อง ต่อมานำพลาสมิดดังกล่าวไปทำการ transform เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) และ BL21-CodonPlus(DE3)-RIL นำเซลล์ที่ได้ไปทำการเหนี่ยวนำให้สร้างโปรตีนด้วย IPTG และทำการเก็บตะกอนเซลล์ปริมาตร 1 ml หลังจากเหนี่ยวนำด้วย IPTG เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และ 16 ชั่วโมง จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ด้วย lysis buffer และใส่ 6X reducing loading dye เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

3.2.5.4 การทำบริสุทธิ์ของชิ้นส่วนต่างๆ ของโปรตีน VP37 ด้วยเทคนิค Ni-NTA affinity chromatography

หลังจากได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนของชิ้นส่วนต่างๆ ของโปรตีน VP37 นำสภาวะดังกล่าวมาทำการผลิตในระดับใหญ่ โดยทำการเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 2 ลิตร ต่อโปรตีนแต่ละรูปแบบ จากนั้นทำบริสุทธิ์โปรตีนเหมือนกับข้อ 3.3.3.1 เมื่อได้โปรตีนที่บริสุทธิ์ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C

3.2.5.5 การทดสอบการจับกันระหว่างชิ้นส่วนต่างๆของโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่ง ด้วยเทคนิค ELISA

สำหรับการทดสอบการจับกันระหว่างโปรตีนของชิ้นส่วนต่างๆ ของโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่ง ซึ่งทำการทดลองเหมือนกับข้อ 3.3.4.2 แต่จะใช้เวลาเข้มข้นของโปรตีนถูกผสมเท่ากับ 0.2 mg/ml

3.2.5.6 การทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างชิ้นส่วนต่างๆของโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่ง ด้วยเทคนิค Immunocytochemistry

สำหรับการทดสอบการจับกันระหว่างโปรตีนของชิ้นส่วนต่างๆ ของโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่ง ซึ่งทำการทดลองเหมือนกับข้อ 3.2.4.3 แต่จะใช้เวลาเข้มข้นของโปรตีนถูกผสมเท่ากับ 0.2 mg/ml โดยใช้โปรตีน Full length (1-281) และโปรตีน Thioredoxin เป็นโปรตีนควบคุม

3.2.6 การทดสอบความสามารถในการจับขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งด้วย Sulfated galactans (SG)

3.2.6.1 การบ่มโปรตีน VP37 กับ Sulfated galactans

ในการทดสอบนี้จะใช้ Sulfated galactan (SG) ซึ่งเป็นหนึ่งในกลุ่มของไกลโคซามิโนไกลแคน (Glycosaminoglycans) มาทำการทดสอบ โดยจะทำการนำโปรตีน VP37 ทั้งรูปแบบ Full length และ C-terminal domain มาทำการบ่มกับ SG ที่ละลายใน PBS ความเข้มข้น 0.1 และ 1 mg/ml ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สำหรับการทดสอบความสามารถในการจับขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งด้วยเทคนิค ELISA และทำการบ่มโปรตีน VP37 ในรูปแบบ C-terminal domain กับ SG ที่ละลายใน PBS ที่อัตราส่วน 1:4 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 °C สำหรับการทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 ในรูปแบบ C-terminal domain กับ SG ด้วยเทคนิค Native-PAGE

3.2.6.2 การทดสอบความสามารถในการจับขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือด กุ้งด้วย Sulfated galactans ด้วยเทคนิค ELISA

นำ hemocyte ที่ได้จากหัวข้อ 3.5.1 ไปทำการ Block ด้วย 5% BSA ที่ละลายอยู่ในอาหาร 2xL15 เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้าง 3 ครั้ง ด้วยอาหาร 2xL15 แล้วทำการเติมโปรตีนที่ได้จากหัวข้อ 3.4.4 ปริมาตร 100 μ l ลงไปใน well ที่มี hemocyte แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้าง 3 ครั้งด้วย 2xL15 แล้วทำการเติม antibody ที่จำเพาะต่อ histidine tag (Anti-His) 1:4000 ที่ละลายอยู่ในอาหาร 2xL15 ปริมาตร 100 μ l บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้าง 3 ครั้ง ด้วยอาหาร 2xL15 แล้วทำการใส่ TMB substrate ปริมาตร 100 μ l บ่มในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที และทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 1M H₂SO₄ แล้วนำไปวัดค่า OD650 สำหรับ control จะทำเหมือนกับที่กล่าวมาแต่จะเป็นโปรตีน VP37 ที่ไม่ได้บ่มกับ Sulfated galactans และไม่มีการใส่ทั้งโปรตีน VP37 และ GAGs

3.2.7 การทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 ในรูปแบบ Full length กับ Heparin

3.2.7.1 การบ่มโปรตีน VP37 กับ Heparin

สำหรับกาทดสอบด้วยเทคนิค Native-PAGE จะนำโปรตีนในรูปแบบ Full length ที่ทำการตัด Fusion tag ออกมาทำการบ่มกับ Heparin ที่ความเข้มข้น 0.0045 mg/ml, 0.045 mg/ml, 0.45 mg/ml, 0.90 mg/ml, 1.8 mg/ml, 2.7 mg/ml และ 3.6 mg/ml

3.2.7.2 การทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 ในรูปแบบ Full length กับ Heparin ด้วยเทคนิค Native-PAGE

นำตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอน 3.1.1 มาทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค native gel electrophoresis โดยทำการเปรียบเทียบกับโปรตีน VP37 ที่ไม่ได้บ่มกับ Heparin แล้วนำไปให้กระแสไฟฟ้าที่ 80 Volt เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง โดยโปรตีนจะทำการเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก ซึ่งโปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่าจะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าโปรตีนที่มีขนาดเล็ก โดยคาดหวังว่าถ้าโปรตีน VP37 สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ Heparin ได้จะต้องสามารถมองเห็นความเข้มของแบนโปรตีนเมื่อทำการย้อมด้วยสี Coomassie stain ค่อยๆลดลง เนื่องจากโปรตีนไปทำการจับกับ Heparin เพิ่มมากขึ้นส่งผลให้โมเลกุล Heparin-VP37 นั้นมีขนาดใหญ่จนไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านช่องว่างระหว่างเจลได้

3.2.8 การทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 ในรูปแบบ Full length กับ Heparin ด้วยเทคนิค Surface Plasmon Resonance

3.2.8.1 การติดฉลาก Heparin ด้วย Biotin

โดยเตรียม Heparin ที่ความเข้มข้น 5 mg/ml ที่ละลายใน 20 mM Sodium phosphate pH 7.4, 150 mM NaCl จากนั้นนำ 1 ml Heparin ที่เตรียมมาทำการบ่มกับ 50 mM Biotin-hydrazide ปริมาตร 25 μ l และ 100 mg/ml 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) ปริมาตร 15 μ l เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 °C จากนั้นทำการเปลี่ยนบัฟเฟอร์ Heparin เข้าสู่บัฟเฟอร์ 20 mM Sodium phosphate pH 7.4, 150 mM NaCl ด้วยการทำให้ dialysis

3.2.8.2 การทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 ในรูปแบบ Full length กับ Heparin

โดยในการทดสอบจะทำการตรึง Heparin บนผิวหน้า SA chip โดยจะทำการติดฉลาก Heparin ด้วย Biotin ตามที่ได้กล่าวในหัวข้อ 3.8.1 จากนั้นนำ 100 μ l ของ Heparin ที่ผ่านการติดฉลากด้วย Biotin มาทำการ Flow ผ่านผิวหน้าของ SA Chip ที่ Flow cell 2 ให้ได้ Response Unit ประมาณ 200 RU จากนั้นทำการ equilibrate ผิวหน้า Chip ด้วย HBS buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 50 μ M EDTA, 0.05% Tween 20) ทั้ง Flow cell 1 และ 2 และทำการทดสอบ kinetic ของโปรตีน VP37 โดยจะทำการทดสอบแบบ Wizard kinetic โดยจะทำการฉีดโปรตีน VP37 ที่ทำการละลายใน HBS buffer ที่ความเข้มข้น 20, 40 และ 70 nM ผ่าน Flow cell 1 และ 2 จากนั้นจะทำการ Regenerate ด้วย 30 μ l 0.5 M NaOH และ 30 μ l 5M NaCl เป็นระยะเวลา 60 วินาที และจะทำการวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นด้วยโปรแกรม BIAevaluation software (version 2.0) โดยจะทำการ Fitted แบบ Heterogeneous ligand model

3.2.8.3 การทดสอบความสามารถในการจับขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 ในรูปแบบ Full length กับ Heparin ด้วย Sulfated galactans

จากการทดลองก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นว่า Sulfated galactans (SG) นั้นมีความสามารถในการจับขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งได้ด้วยเทคนิค ELISA ดังนั้นจึงเกิดสมมติฐานว่าการที่ SG สามารถยับยั้งปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งได้นั้นเกิดจากการที่ SG ไปขัดขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ Heparin หรือไม่จึงทำการทดสอบด้วยเทคนิค SPR โดยทำการละลาย Sulfated galactans ใน HBS buffer ที่ความเข้มข้น 0, 0.8, 1.6 และ 3.2 μ M แล้วทำการบ่มกับโปรตีน VP37 ที่ความเข้มข้น 20 mM เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 °C จากนั้นทำการ

ฉีด VP37-SG ผ่าน flow cell ที่ 1 และ 2 ที่ความเร็ว 30 μl ต่อนาที โดยจะทำการฉีดเป็นเวลา 5 นาที โดยแต่ละความเข้มข้นของ VP37-SG จะทำการ regenerate ด้วย 30 μl 0.5 M NaOH และ 30 μl 5M NaCl เป็นระยะเวลา 60 วินาที

3.3 การตกผลึกโปรตีน VP37

3.3.1 การตกผลึกโปรตีน VP37 ด้วยเทคนิค under oil

นำโปรตีนจากขั้นตอน 3.2.3.3 มาทำการตกผลึกโปรตีนด้วยเทคนิค under oil โดยขั้นแรกจะทำการทดสอบด้วยบัฟเฟอร์ 96 ชนิดที่แตกต่างกัน NeXtal Stock Solution Kits (Qiagen) โดยจะทำการหยด parafilm oil ปริมาตร 40 μl ลงในหลุม MRC Under oil crystallization plate (96 well plate) จากนั้นทำการหยดสารละลายโปรตีนที่ความเข้มข้น 10 mg/ml ปริมาตร 1 μl ลงไปในหลุมที่มี parafilm oil บรรจุอยู่ จากนั้นทำการหยด crystallization buffer ปริมาตร 1 μl ลงไปโดยจะต้องทำให้สารทั้งสองรวมตัวกันเป็นหยดเดียว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C และทำการบันทึกผลทุกวัน และเมื่อพบผลึกโปรตีนจะทำการนำผลึกดังกล่าวไปทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค SDS-PAGE

3.3.2 การทำ X-ray diffraction

ทำการย้ายผลึกที่ได้ในขั้นตอน 3.3.1 ไปสู่ Cryo buffer (0.1 M Na acetate pH 4.6, 30% (v/v) MPD, 0.02 M Ca Chloride, 20% glycerol) จากนั้นนำผลึกที่อยู่ใน Cryo buffer ไปทำการยิงแสงซินโครตรอน เพื่อนำไปทำการยิงแสงซินโครตรอนที่ KEK-Photon Factory beamline BL-17A โดยจะทำการหล่อเย็นผลึกด้วยไนโตรเจนเหลวเพื่อป้องกันการเสียหายของผลึกในขณะที่ทำการยิงแสงซินโครตรอน

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาบทบาทหน้าที่ของโปรตีน VP37

4.1.1 การสร้างพลาสมิดลูกผสม pET-15b (+)-Thio-VP37 สำหรับใช้ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนด้วยระบบ *E. coli*

4.1.1.1 การเตรียมยีน VP37 และพลาสมิดสำหรับสร้างพลาสมิดลูกผสม pET-15b (+)-Thio-VP37

ในการออกแบบ primer สำหรับการ amplified ขึ้นยีน VP37 สำหรับใช้โคลนเข้าพลาสมิด pET-15b(+)-Thio โดยจะใช้ start codon และ stop codon ของพลาสมิดเพื่อให้มี His tag ติดอยู่บนโปรตีนในส่วน N-terminal ของลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อประโยชน์สำหรับขั้นตอนการทบทวิธีโปรตีน เนื่องจาก His tag มีความจำเพาะกับ Ni-NTA bead ที่ใช้ในการทำบริสุทธิ์ จากนั้นทำการวิเคราะห์ restriction map ของพลาสมิด pET-15b(+) และขึ้นยีน เพื่อเลือก restriction site ที่เหมาะสม ซึ่งเอนไซม์ที่เลือกใช้จะต้องไม่ตัดขึ้นยีน VP37 ผลที่ได้หลังจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนและ restriction site ทำให้สามารถออกแบบ primer ซึ่งสามารถสรุปได้ดังที่แสดงไว้ในตาราง

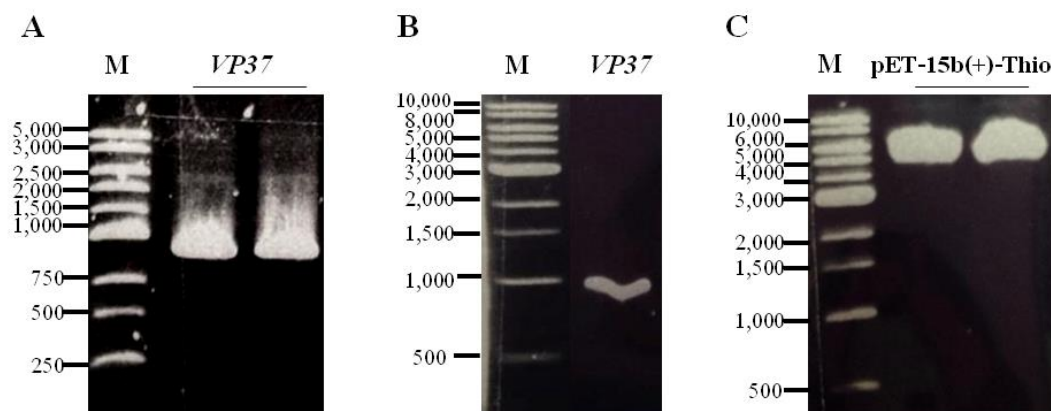
ตารางที่ 4.1 ตาราง primers สำหรับใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน VP37 และชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้เป็นตำแหน่งในการสร้างพลาสมิดลูกผสม pET-15b(+)-Thio-VP37

ยีน	Primer	เอนไซม์ตัดจำเพาะ	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer
VP37	F: pET-15b(+)-Thio-VP37	<i>Bam</i> HI, <i>Xho</i> I	5'CGGGATCCGCGGTAACTTGGATAATGTTCT 3'
	R: pET-15b(+)-Thio-VP37		5'CCGCTCGAGTTATGTCCAACAATTTAAAAAGA AGTAGATGA 3'

หลังจากได้ primer มาใช้ในกระบวนการ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนขึ้นยีนแล้ว จะทำการเพิ่มจำนวนขึ้นยีนตามสถานะที่ได้กล่าวไปในขั้นตอนการทำในข้างต้นจากนั้นนำไปตรวจสอบหาขนาดของขึ้นยีน VP37 ด้วยวิธี gel electrophoresis ที่มีความเข้มข้นของ agarose gel เท่ากับ 1.0 % ใน TBE buffer โดยเทียบกับขนาด DNA มาตรฐาน ผลการทดลองพบแถบของยีน VP37 ตามที่คาดหวังไว้คือประมาณ 843 bp ดังรูปที่ 4.1A จากนั้นทำการตัดขึ้นยีน VP37 ที่ได้จากการทำ PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I จากนั้นนำไปตรวจสอบหาขนาดของ DNA ด้วยวิธี gel electrophoresis ที่มีความ

เข้มข้นของ agarose gel เท่ากับ 1.0 % ใน TBE buffer โดยเทียบกับขนาด DNA มาตรฐาน ผลพบว่า ยีน VP37 ที่ถูกตัดมีขนาดตามที่คาดหวังไว้คือประมาณ 1 kbp ตามทฤษฎีคือมีขนาด 843 bp เนื่องจาก PCR product ทุกชนิดที่ถูกตัดจะมีการถูกตัดไปเพียงไม่กี่เบสจึงทำให้ไม่สามารถเห็นความแตกต่างของแถบ DNA เมื่อเปรียบเทียบ ระหว่างแถบ DNA ของยีนก่อนตัดและหลังตัด หลังจากการตัดนั้นพบว่า DNA yield ที่ได้มีปริมาณลดลง เนื่องจากผ่านการถูกทำให้บริสุทธิ์ ดังนั้นเพื่อให้ได้ปริมาณที่เข้มข้นขึ้นจึงทำการรวม purified PCR product ที่ทำการตัดด้วย restriction enzyme สองหลอดเข้าด้วยกันแล้วทำการ elute ออกมาในปริมาตรปกติ DNA ที่ได้จะมีความเข้มข้นสูงพอที่จะสามารถนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไปได้ ดังรูปที่ 4.1B

ในการเตรียมพลาสมิด pET-15b(+)-Thio จะต้องทำการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Bam*HI และ *Xho*I เพื่อนำไปเชื่อมต่อกับยีน VP37 ที่เตรียมไว้ โดยจะทำการตรวจสอบคุณภาพพลาสมิดที่ถูกตัด ด้วยการทำ gel electrophoresis ด้วย gel ที่มีความเข้มข้นของ agarose เท่ากับ 1.0 % ใน TBE buffer เมื่อเทียบกับขนาด DNA มาตรฐาน แล้วพบว่าพลาสมิดที่ถูกตัดมีขนาดประมาณ 6000 bp ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดที่คาดหมายไว้ ตามทฤษฎีคือมีขนาด 6150 bp ซึ่งก็คือขนาดของพลาสมิด pET-15b(+)-Thio เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ ดังรูปที่ 4.1C



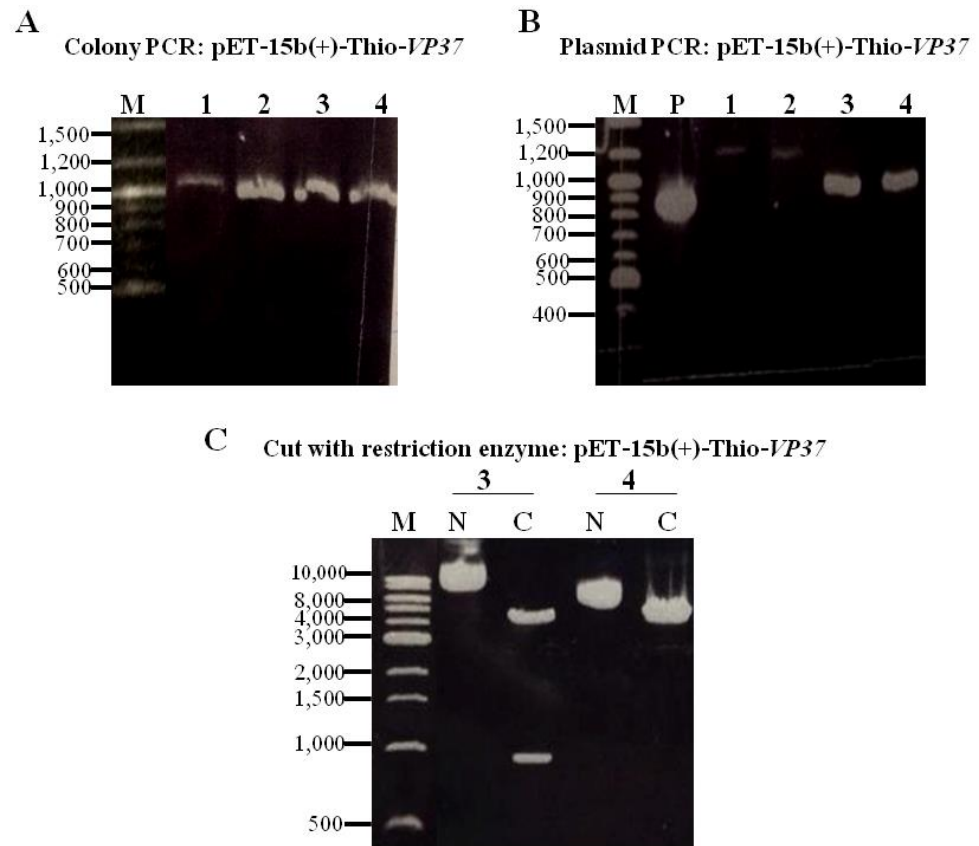
รูปที่ 4.1 ผลการเตรียมชิ้นยีน VP37 (A) ผล gel electrophoresis จากการเพิ่มจำนวนยีน VP37 ด้วยเทคนิค PCR (B) ผลจากการตัดชิ้นยีน VP37 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I (C) ผลจากการตัดพลาสมิด pET-15b(+)-Thio ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I (M คือ แถบขนาด DNA มาตรฐาน)

4.1.1.2 การคัดเลือกเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม pET-15b(+)-Thio-VP37

หลังจากทำการเชื่อมยีน VP37 กับพลาสมิด pET-15b(+)-Thio และทำการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสม pET-15b(+)-Thio-VP37 เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α แล้วนำโคโลนีที่เกิดขึ้นไปตรวจสอบว่าโคโลนีใดที่ได้รับพลาสมิดที่มียีน VP37 หรือไม่ ด้วยวิธี colony PCR จากรูปที่ 4.2A คือ ผลการทำ gel electrophoresis โดยเทียบกับขนาด DNA มาตรฐาน พบว่าเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมที่มียีน VP37 ให้ผลบวกทั้งหมด 4 โคโลนี โดยแถบ DNA ที่พบมีขนาดประมาณ 1,000 bp ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของยีน VP37 ที่มีขนาดเท่ากับ 843 bp

เพื่อทำการยืนยันผลบวกจากการทำ colony PCR จึงใช้การตรวจสอบยืนยัน VP37 ด้วยการทำ plasmid PCR โดยจะต้องทำการนำโคโลนีที่ให้ผลบวกไปเลี้ยงในอาหาร LB broth ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดพลาสมิดและใช้เป็น template ในการทำ plasmid PCR เพื่อทดสอบว่าพลาสมิดที่ได้นั้นมียีน VP37 อยู่หรือไม่ ผลจากการทำ plasmid PCR จะเห็นว่าได้ผลบวกจำนวน 2 พลาสมิดจากทั้งหมด 4 พลาสมิด คือพลาสมิดที่ได้จากโคโลนีที่ 3 และ 4 โดยแถบ DNA ที่พบมีขนาดประมาณ 1,000 bp ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของยีน VP37 ที่มีขนาดเท่ากับ 843 bp ดังรูปที่ 4.2B

เพื่อทำการยืนยันผลบวกจากการทำ plasmid PCR จึงใช้การตรวจสอบยืนยัน VP37 ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยนำพลาสมิดที่ให้ผลบวกมาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I ซึ่งเป็นเอนไซม์เดียวกับที่ใช้ในการเชื่อมทั้งสองส่วนเข้าด้วยกัน จากนั้นนำไปตรวจสอบหาขนาดของยืนยัน VP37 ด้วยการทำ gel electrophoresis ที่มีความเข้มข้นของ agarose gel เท่ากับ 1.0 % ใน TBE buffer โดยเทียบกับพลาสมิดที่ไม่ได้ตัด พบว่ายีน VP37 ในโคโลนีที่ 3 มีขนาดตามที่คาดหวังไว้คือประมาณ 6,000 bp และ 800 bp ซึ่งตรงกับขนาดของพลาสมิด pTAT และยีน VP37 ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.2C



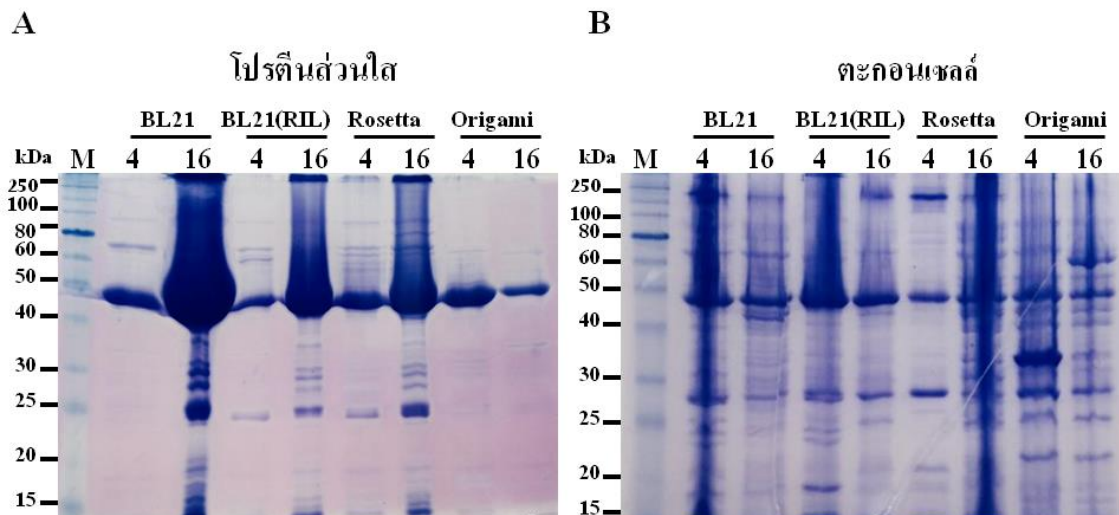
รูปที่ 4.2 การตรวจสอบยืนยัน VP37 จากการสร้างพลาสมิดลูกผสม pET-15b(+)-Thio-VP37 (A) ผลการทำ colony PCR จากโคโลนีที่ 1-4 (B) ผลการทำ plasmid PCR จากพลาสมิดของโคโลนีที่ 1-4 (C) ผลตัดพลาสมิดลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I ของโคโลนีที่ 3 และ 4 (M คือ ขนาด DNA มาตรฐาน, P คือ positive control ของการทดลอง, N คือพลาสมิดที่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ, C คือพลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ)

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทำการวิเคราะห์ความถูกต้องของลำดับกรดอะมิโนที่ผ่านการแปลรหัสจากลำดับเบสบนพลาสมิดลูกผสม โดยทำส่งตัวอย่างพลาสมิดลูกผสม pET-15b(+)-Thio-VP37 จาก 2 โคโลนีที่ต่างกัน ไปทำการวิเคราะห์ความถูกต้องของลำดับกรดอะมิโนด้วยวิธี Nucleotide sequencing จากผลการทดลองพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์จากพลาสมิดลูกผสม pET-15b(+)-Thio-VP37 ที่ได้นั้นมีความเหมือนกับนิวคลีโอไทด์ต้นแบบ 100% ซึ่งแน่นอนว่าเมื่อทำการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนของโปรตีน VP37 จะทำให้ได้โปรตีนที่มีความสมบูรณ์เหมือนโปรตีนต้นแบบ ซึ่งจากการทดลองเหล่านี้จึงสรุปได้ว่า พลาสมิดลูกผสม pET-15b(+)-Thio-VP37 เป็นพลาสมิดที่มีความสมบูรณ์สามารถนำไปใช้ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนและการทดลองอื่นๆ ได้ต่อไป

4.1.2 การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม VP37 ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli*

4.1.2.1 ผลการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม VP37 ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* 4 สายพันธุ์ ได้แก่ BL21(DE3), Rosetta, Origami และ BL21-codonPlus(DE3)-RIL

จากการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม VP37 ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* จะทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตโปรตีนลูกผสม VP37 ด้วยสาร Isophanyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของน้ำตาลกาแลคโตส ที่มีโมเลกุลคล้ายกับ beta-galactoside และ allolactose ซึ่งโมเลกุล allolactose มีหน้าที่ในการเป็น inducer ที่ทำให้ repressor I หลุดออกจาก operator ส่งผลให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนภายใต้การควบคุมของ Lac promotor หลังจากทำการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสม pET-15b(+)-Thio-VP37 เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* จำนวน 4 สายพันธุ์คือ BL21(DE3) , BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, Rosetta และ Origami จากนั้นทำการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ในอาหารเหลว LB broth ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin ที่อุณหภูมิ 37°C จนกระทั่งเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* เข้าสู่ระยะการแบ่งตัวแบบ mid-log phase หรือวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD₆₀₀ ได้ค่าประมาณ 0.6 ซึ่งเป็นช่วงปลายของระยะที่แบคทีเรียมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วในอัตราคงที่ที่เหมาะสมต่อการทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตโปรตีน จากนั้นเหนี่ยวนำการแสดงออกของโปรตีนด้วยสาร IPTG และนำไปแช่ที่อุณหภูมิต่ำ ประมาณ 20°C เพื่อให้เซลล์ค่อยๆ เกิดการผลิตโปรตีนและส่งเสริมให้โปรตีนมีการม้วนพับที่ดีขึ้นและทำให้โปรตีนอยู่ในรูปที่สามารถละลายน้ำได้ แล้วทำการเก็บตัวอย่างที่ 4 และ 16 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดโปรตีนออกจากเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* แล้วนำไปแยกโปรตีนส่วนใสและตะกอนเซลล์ เพื่อนำไปตรวจสอบว่าโปรตีนลูกผสม VP37 ที่ผลิตได้นั้นอยู่ในรูปที่สามารถละลายน้ำได้ หรืออยู่ในรูปที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ โดยโปรตีนส่วนใสจะถูกนำไปบ่มกับ Ni-NTA bead นำตัวอย่างโปรตีนมาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE เพื่อตรวจสอบคุณภาพของโปรตีน VP37

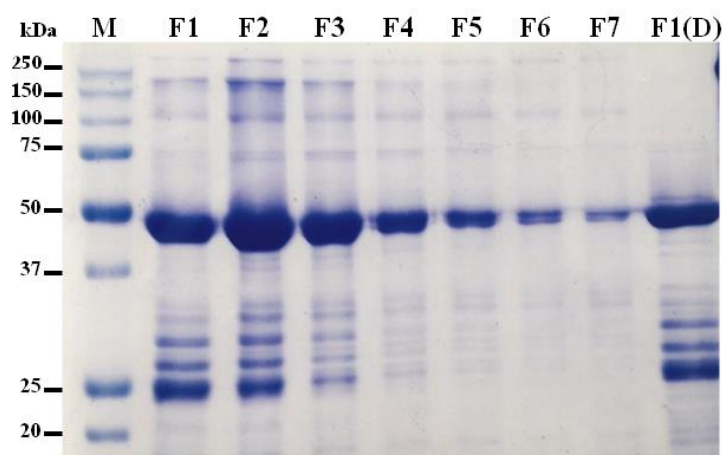


รูปที่ 4.3 ผลแสดงออกของโปรตีนลูกผสม VP37 ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3), BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, Rosetta และ Origami induce ที่อุณหภูมิ 20°C ซึ่งใช้เวลาหลังการเหนี่ยวนำ ด้วย IPTG ที่ 4 ชั่วโมง และ 16 ชั่วโมง รูป A คือโปรตีนส่วนใส (supernatant) ที่จากบ่มกับ Ni-NTA bead รูป B คือ โปรตีนในส่วนของตะกอนเซลล์ (pellet) (M คือแถบโปรตีนมาตรฐาน, 4 คือเวลาหลังการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่ 4 ชั่วโมง, 16 คือเวลาหลังการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่ 16 ชั่วโมง)

จากรูปที่ 4.3 เป็นการแสดงผล SDS-PAGE ของโปรตีนที่ผลิตโดย *E. coli* ทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ BL21(DE3), Rosetta, Origami และ BL21 ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมที่มียีน pET-15b(+)-Thio-VP37 พบว่า *E. coli* ทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถทำให้โปรตีนเกิดการ over expression ได้ในรูป soluble form และจะยังคงเห็นโปรตีนเหลืออยู่ในส่วนของตะกอนเซลล์เพียงเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเกิดจากขั้นตอนการทำให้เซลล์แตกไม่หมดจึงทำให้ยังคงหลงเหลือโปรตีนในส่วนของตะกอนเซลล์ โดยขนาดของโปรตีนที่ตรวจพบบน SDS-PAGE มีขนาดประมาณ 50 kDa ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลของ VP37-thioredoxin ตามทฤษฎีที่คำนวณได้จาก ExPASy Bioinformatics Resource Portal คือ 48.17 kD และมีค่า pI = 4.83 จากการทดลองพบว่าโปรตีน VP37-thioredoxin ที่ผลิตได้จากเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) เมื่อทำการ induce ด้วย IPTG เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่สามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณมากที่สุดเมื่อเทียบกับสภาวะอื่นๆ ซึ่งในการทดลองต่อไปจะใช้สภาวะนี้ในการผลิตโปรตีน VP37-thioredoxin เพื่อใช้ในการทดลองอื่นๆต่อไป

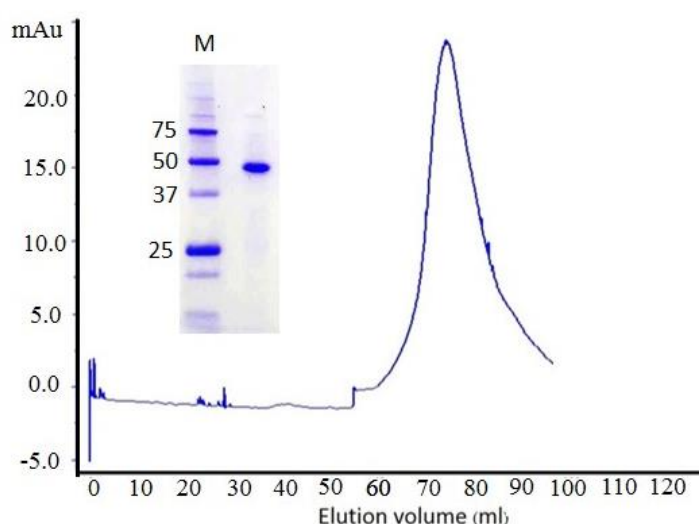
4.1.3 การผลิตและทำบริสุทธิ์โปรตีนลูกผสม VP37 ด้วยเทคนิค Ni-NTA affinity Chromatography

จากผลการทดลองก่อนหน้านี้จะทำให้ทราบว่าพลาสมิดลูกผสม pET-15b(+)-Thio-VP37 ที่ทำการ ถ่ายโอนเข้าสู่ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ที่อุณหภูมิ 20 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง มีความสามารถในการแสดงออกของโปรตีนมากที่สุด จึงได้คัดเลือกมาทำการทำบริสุทธิ์โปรตีนต่อไป โดยทำการผลิตจำนวน 6 ลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 2XYT เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง จากนั้นนำมา induce ด้วย IPTG แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วย Ni-NTA bead โดยจะแบ่งเป็นคอลัมน์ละ 2 ลิตร และทำการชะโปรตีนด้วย elution buffer จากนั้นนำเอาโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้มาทำการตรวจสอบการแสดงออกด้วยวิธี SDS-PAGE ปรากฏว่าพบแถบของโปรตีนที่ขนาดประมาณ 50 kDa ซึ่งตรงกับค่าน้ำหนักโมเลกุลของ VP37-thioredoxin ตามทฤษฎีที่คำนวณได้จากโปรแกรม ExPASy Bioinformatics Resource Portal คือ 48.17 kDa หลังจากการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนพบว่าได้โปรตีนในปริมาณมากใน fraction ที่ 1 -5 ของทั้ง 3 คอลัมน์ (รูปที่ 4.4) จึงทำการรวมโปรตีนและทำการย้ายโปรตีนมาอยู่ใน PBS buffer pH 8.0 ด้วย PD10 column เพื่อนำโปรตีนที่ได้ไปทำการทดสอบหน้าที่ต่อไป



รูปที่ 4.4 ผลการทำบริสุทธิ์โปรตีนลูกผสม VP37 ด้วยเทคนิค Ni-NTA affinity chromatography และวิเคราะห์แถบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ซึ่งแสดงโปรตีน VP37 ที่ทำการชะโปรตีนออกจาก Ni-NTA bead จำนวน 7 ครั้ง (F1-F7) (M คือแถบโปรตีนมาตรฐาน, F(1-7) คือจำนวนครั้งในการชะโปรตีนออกจาก Ni-NTA bead , F1(D) คือการชะโปรตีนออกจาก Ni-NTA bead ครั้งที่ 1 และทำการผสมด้วย reducing loading dye)

แต่จากการทำบริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA affinity chromatography นั้นพบว่าโปรตีนมีความบริสุทธิ์ไม่เพียงพอต่อการนำไปทดสอบความสามารถในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดกึ่ง ดังนั้นจึงทำการทำบริสุทธิ์อีกครั้งด้วยเทคนิค Gel filtration ผ่านเครื่อง Fast liquid chromatography (FPLC) โดยอาศัยการแยกโปรตีนตามขนาดโมเลกุล จากนั้นทำให้โปรตีนมีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นโดยใช้เซนต์คอน แล้วนำโปรตีนที่ได้มาทำการทดสอบด้วย SDS-PAGE ดังแสดงในรูป 4.5 จากการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีน VP37 รูปแบบ Full length ด้วยเทคนิค Gel filtration พบว่าโปรตีน VP37 รูปแบบ Full length นั้นประสบความสำเร็จในการผลิตและทำบริสุทธิ์ในระบบ *E.coli* และมีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะเห็นได้จากผลที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ด้วย Gel filtration ที่แสดงผลเป็น symmetric peak (รูปที่ 4.5) ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงจะทำการนำโปรตีนที่ผลิตได้นี้ไปทำการทดสอบความสามารถในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งต่อไป

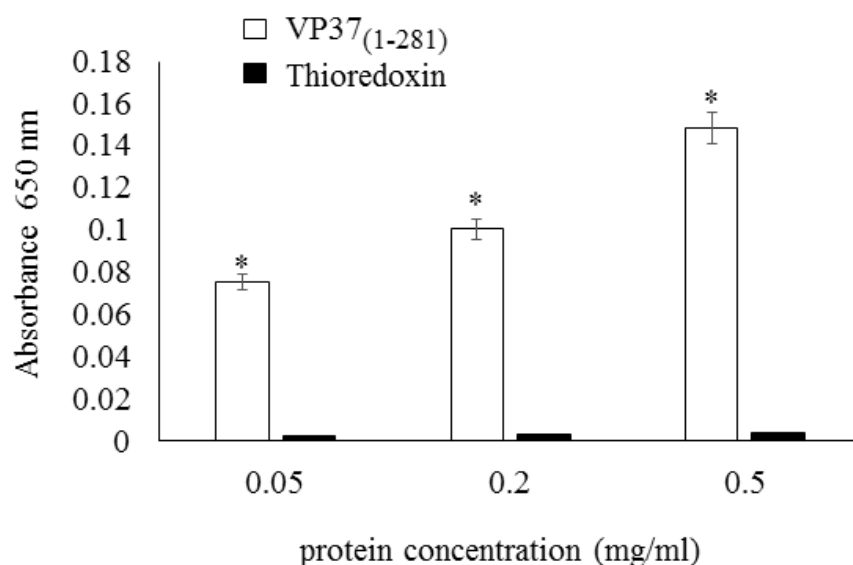


รูปที่ 4.5 การทำบริสุทธิ์โปรตีน VP37 รูปแบบ Full length ด้วยเทคนิค Gel filtration

4.1.4 การทดสอบการจับกันระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่ง ด้วยเทคนิค ELISA และ Immunocytochemistry

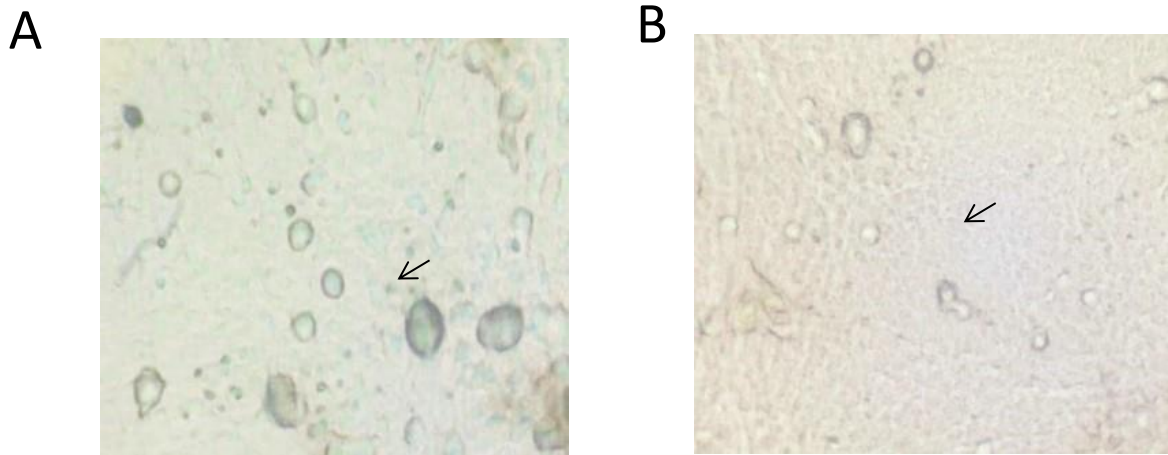
จากงานวิจัยก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีน VP37 น่าจะมีปฏิสัมพันธ์กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่ง ดังนั้นเราจึงสนใจที่จะทำการทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 ได้จริงหรือไม่ในสภาวะธรรมชาติ โดยในการทดลองจะทำการควบคุมคุณภาพโปรตีนและใช้เทคนิค ELISA ในการทดสอบ จากการทดลองพบว่าโปรตีน VP37 มีความสามารถในการจับได้กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งได้แบบ dose dependent กล่าวคือ

การจับกันระหว่างเซลล์เม็ดเลือดกึ่งมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเมื่อทำการบ่มกับโปรตีน VP37 ที่มีความเข้มข้นที่สูงขึ้น ดังรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 แสดงผลการทดสอบการจับกันของโปรตีน VP37 และเซลล์เม็ดเลือดกึ่งด้วยวิธี ELISA โดยใช้โปรตีน VP37 ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.2 และ 0.5 mg/ml และใช้โปรตีน Thioredoxin สำหรับเป็นการทดลองควบคุม

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าโปรตีน VP37 มีคุณสมบัติที่สามารถจับได้กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่ง ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงจะทำการยืนยันความสามารถในการจับของโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งด้วยเทคนิค immunocytochemistry โดยทำการบ่มโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งและทำการติดตามโปรตีน VP37 ด้วย anti-His antibodies ที่มีการติดฉลากด้วยเอนไซม์ จากนั้นทำการตรวจสอบผลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งด้วยการเติม TMB substrate โดยถ้าเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งจะปรากฏสีน้ำเงินให้เห็นบนผิวเซลล์เซลล์เม็ดเลือดกึ่ง แต่ในทางกลับกันหากโปรตีน VP37 นั้นไม่เกิดปฏิสัมพันธ์กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งก็จะไม่ปรากฏสีน้ำเงินบนผิวเซลล์กึ่ง ดังแสดงในรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 การทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งด้วยเทคนิค Immunocytochemistry. (A) เซลล์เม็ดเลือดกึ่งบ่มกับโปรตีน VP37 (B) เซลล์เม็ดเลือดกึ่งบ่มกับ ThioRedoxin ทำหน้าที่เป็น negative control

ซึ่งจากการทดสอบการจับกันของโปรตีน VP37 และเซลล์เม็ดเลือดกึ่งด้วยวิธี ELISA และ immunocytochemistry ทำให้แน่ใจได้ว่าโปรตีน VP37 ที่ทำการผลิตขึ้นในระบบ *E.coli* มีความสามารถในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งได้จริง ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงอยากทราบว่าโปรตีนในส่วนใดของโปรตีน VP37 ที่มีความสามารถในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดกึ่ง โดยจะทำการออกแบบโปรตีน VP37 ให้มีขนาดต่างๆกันเพื่อใช้ในการทดสอบ

4.2. การศึกษาหาบริเวณบนโปรตีน VP37 ที่ใช้ในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดกึ่ง

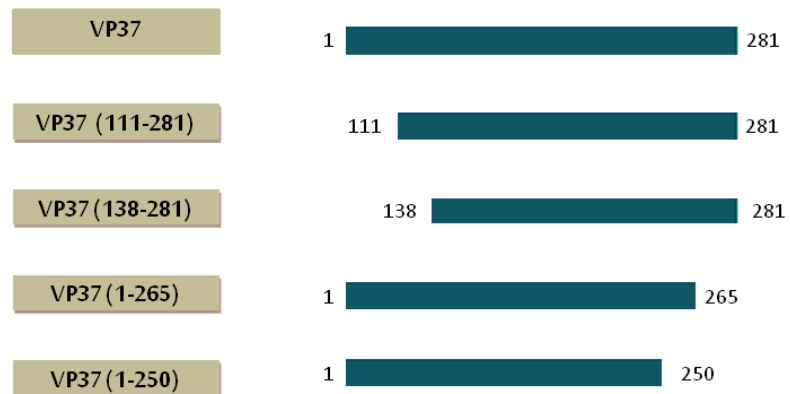
4.2.1 การสร้างพลาสมิดลูกผสมขึ้นส่วนต่างๆ ของโปรตีน VP37

การออกแบบขึ้นส่วนต่างๆ ของโปรตีน VP37 จะอ้างอิงจาก secondary structure ของโปรตีน VP37 ซึ่งโปรตีนขึ้นส่วนต่างๆ ของโปรตีน VP37 มีทั้งหมด 4 รูปแบบ คือ VP37(111-281), VP37(138-281), VP37(1-265) และ VP37(1-250) ดังแสดงในรูป 4.8

A



B



รูปที่ 4.8 การออกแบบบริเวณที่ครอบคลุมชิ้นส่วนต่างๆของโปรตีน VP37 (A) โครงสร้างลำดับที่สองของโปรตีน VP37 (B) บริเวณครอบคลุมรูปแบบต่างๆ ของโปรตีน VP37

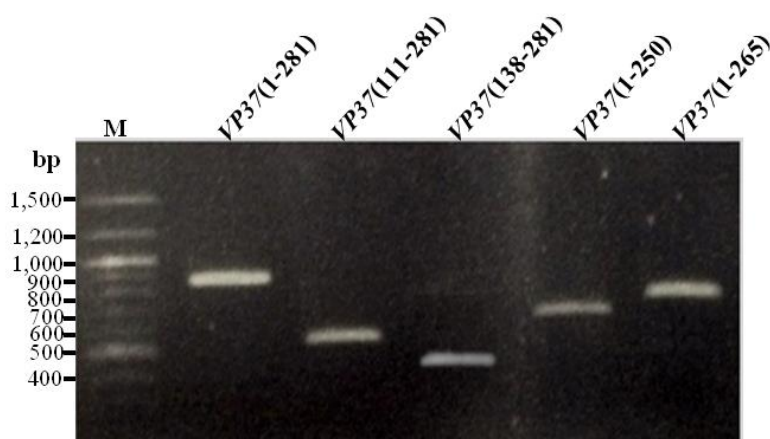
การออกแบบ primer สำหรับทำ PCR ชิ้นยีนของ truncate version ต่างๆ โดยอ้างอิงจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP37 ในฐานข้อมูล NCBI ซึ่งจะทำให้การโคลนเข้าพลาสมิด pET-15b(+)-Thio-VP37 ซึ่งจะมี Histidine tag ติดอยู่กับโปรตีนในส่วน N-terminal ของลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อประโยชน์สำหรับขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ เนื่องจาก Histidine tag มีความจำเพาะกับ Ni-NTA bead ที่ใช้ในการทำบริสุทธิ์ โดย primer ของ truncate version ต่างๆ สามารถสรุปได้ดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 restriction endonuclease และ nucleotide sequence ของ primers truncate version VP37

ยีน	Primer	เอนไซม์ ตัดจำเพาะ	ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ primer
VP37 (111-281)	F: pET-15b(+)-Thio- <i>VP37</i> (111-281)	<i>Bam</i> HI <i>Xho</i> I	5'CGGGATCCGCGGATTTTTTACTGGACC GAA 3'
	R: pET-15b(+)-Thio- <i>VP37</i> (111-281)		5'CCGCTCGAGTTATGTCCAACAATTTAA AAAGAAGTAGATGA 3'
VP37 (138-281)	F: pET-15b(+)-Thio- <i>VP37</i> (138-281)	<i>Bam</i> HI <i>Xho</i> I	5'CGGGATCCTCAGATTCAAAAAGTCA ACAGTC 3'
	R: pET-15b(+)-Thio- <i>VP37</i> (138-281)		5'CCGCTCGAGTTATGTCCAACAATTTAA AAAGAAGTAGATGA 3'
VP37 (1-265)	F: pET-15b(+)-Thio- <i>VP37</i> (1-265)	<i>Bam</i> HI <i>Xho</i> I	5'CGGGATCCGCGGTAAACTTGGATAAT GTTCT 3'
	R: pET-15b(+)-Thio- <i>VP37</i> (1-265)		5'CCGCTCGAGTTAAATTTTCATCTCTGTT GTTTTTCAGCGA 3'
VP37	F: pET-15b(+)-Thio- <i>VP37</i> (1-250)	<i>Bam</i> HI	5'CGGGATCCGCGGTAAACTTGGATAAT GTTCT 3'

(1-250)	R: pET-15b(+)-Thio- VP37(1-250)	<i>XhoI</i>	5'CCGCTCGAGTTATTGTTTGGGTATTAA AAAACCAT ATTTACCTTC 3'
---------	--	-------------	---

หลังจากได้ primer มาใช้ในกระบวนการ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนขึ้นแล้ว จะทำการเพิ่มจำนวนขึ้นขึ้นตามสถานะที่ได้กล่าวไปในขั้นตอนการทำการทดลอง จากนั้นนำไปตรวจสอบหาขนาดของ PCR product ด้วยการทำ gel electrophoresis ที่มีความเข้มข้นของ agarose gel เท่ากับ 1.0 % ใน TBE buffer โดยเทียบขนาดกับขนาด DNA มาตรฐาน พบว่ามีแถบของยีน VP37 ที่มีขนาดประมาณ 843 bp, VP37 (111-281) ที่มีขนาดประมาณ 513 bp, VP37 (138-281) ที่มีขนาดประมาณ 432 bp, VP37 (1-265) ที่มีขนาดประมาณ 795 bp และ VP37 (1-250) ที่มีขนาดประมาณ 750 bp จากนั้นทำการตัดชิ้น PCR product และพลาสมิด pET-15b(+)-Thio ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* และ *XhoI* และทำการเชื่อมขึ้นขึ้นกับพลาสมิด pET-15b(+)-Thio ด้วยเอนไซม์ T4-ligase และถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมด้วยเทคนิค colony PCR และ plasmid PCR ซึ่งผลการทดลองจากการทำ plasmid PCR แสดงให้เห็นว่าพบแถบของ DNA ขนาดตรงกับขนาดของขึ้นขึ้นในแต่ละ version ดังรูปที่ 4.9 และจากผลการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงให้เห็นว่าเราประสบความสำเร็จในการสร้างพลาสมิดลูกผสมทั้ง 4 รูปแบบ

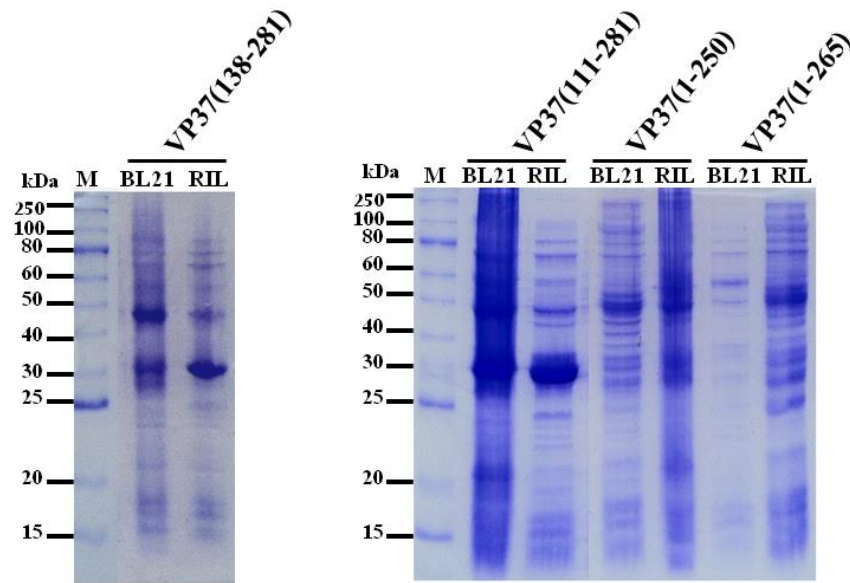


รูปที่ 4.9 ผลการตรวจสอบขึ้นขึ้น VP37 ของพลาสมิดลูกผสมรูปแบบต่างๆ ได้แก่ VP37(1-281), VP37(111-281), VP37(138-281), VP37(1-265) และ VP37(1-250) โดยใช้เทคนิค plasmid PCR (แถบ M คือขนาด DNA มาตรฐาน)

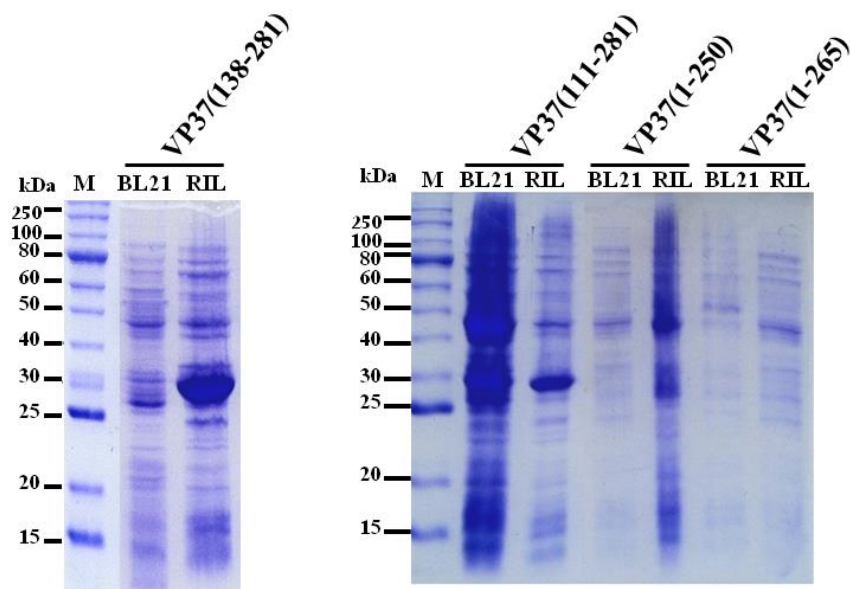
4.2.2 ผลการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมของรูปแบบต่างๆของโปรตีน VP37 ใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) และ BL21-CodonPlus(DE3)-RIL

ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมจะทำการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสม pET-15b(+)-Thio-VP37(111-281), pET-15b(+)-Thio-VP37(138-281), pET-15b(+)-Thio-VP37(1-265) และ pET-15b(+)-Thio-VP37(1-250) เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* 2 สายพันธุ์คือ BL21(DE3) และ BL21-CodonPlus(DE3)-RIL จากนั้นทำการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมบนอาหารแข็ง LB Agar ที่มี ampicillin เป็นยาปฏิชีวนะ จากนั้นนำโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารแข็งไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB broth ที่มี ampicillin เป็นยาปฏิชีวนะ นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37°C 200 rpm เป็นเวลา 4 hr หรือจนกระทั่งได้ ($OD_{600} \sim 0.6$) จากนั้นเหนี่ยวนำการแสดงออกของโปรตีนโดยการเติม IPTG ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 mM จากนั้นลดอุณหภูมิลงให้อยู่ที่ 20°C แล้วทำการเก็บตัวอย่างที่ 4 และ 16 ชั่วโมง จากนั้นนำตะกอนเซลล์มาละลายด้วย lysis buffer และทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE เพื่อตรวจสอบคุณภาพของโปรตีนที่สนใจ

จากรูปที่ 4.10 และ 4.11 แสดงผลจากการวิเคราะห์คุณภาพโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ของโปรตีนหลังถูกเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนเป็นเวลา 4 ชั่วโมง และ 16 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยทำการผลิตใน *E. coli* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ BL21(DE3) และ BL21-CodonPlus(DE3)-RIL ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม pET-15b(+)-Thio-VP37(111-281), pET-15b(+)-Thio-VP37(138-281), pET-15b(+)-Thio-VP37(1-265) และ pET-15b(+)-Thio-VP37(1-250) จากการทดลองพบขนาดของโปรตีนบน SDS-PAGE มีขนาดดังต่อไปนี้โปรตีน VP37(111-281) พบขนาดประมาณ 34 kDa ทั้งในสายพันธุ์ BL21(DE3) และ BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, โปรตีน VP37(138-281) พบขนาดประมาณ 30 kDa มากในสายพันธุ์ BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, โปรตีน VP37(1-265) พบขนาดประมาณ 45 kDa มากในสายพันธุ์ BL21-CodonPlus(DE3)-RIL และ โปรตีน VP37(1-250) พบขนาดประมาณ 47 kDa มากในสายพันธุ์ BL21 ซึ่งแต่ละโปรตีนมีค่าใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนชนิดนั้นๆตามทฤษฎีที่คำนวณได้จาก ExPASy Bioinformatics Resource Portal จากการทดลองพบว่ารูปแบบต่างๆของโปรตีน VP37 ที่ผลิตได้จากเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21-CodonPlus(DE3)-RIL เมื่อทำการเหนี่ยวนำด้วย IPTG เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่สามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณมากที่สุดเมื่อเทียบกับสภาวะอื่นๆ ซึ่งในการทดลองต่อไปจะใช้สภาวะนี้ในการผลิตโปรตีน เพื่อใช้ในการทดลองอื่นๆต่อไป



รูปที่ 4.10 ผลการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม VP37(111-281), VP37(138-281), VP37(1-265) และ (1-250) ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) และ BL21-CodonPlus(DE3)-RIL ซึ่งใช้เวลาหลังการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่เวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20 °C ในส่วนของโปรตีนทั้งหมดในเซลล์



รูปที่ 4.11 ผลการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม VP37(111-281), VP37(138-281), VP37(1-265) และ VP37(1-250) ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) และ BL21-CodonPlus(DE3)-RIL ซึ่งใช้เวลาหลังการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่เวลา 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20 °C ในส่วนของโปรตีนทั้งหมดในเซลล์

4.3 การผลิตและทำบริสุทธิ์ชิ้นส่วนต่างๆ ของโปรตีน VP37 ด้วยเทคนิค Ni-NTA affinity chromatography

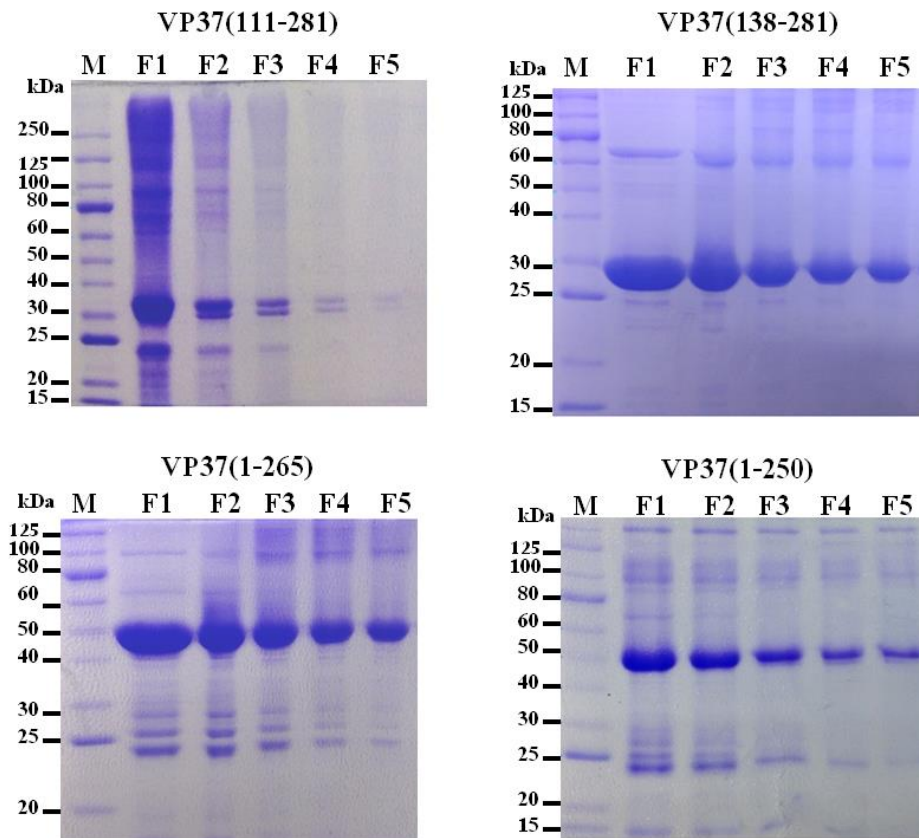
จากผลการทดลองที่ 4.2.2 ทำให้ทราบว่าพลาสมิดถูกผสมรูปแบบต่างๆ ของ VP37 ที่ทำการถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21-CodonPlus(DE3)-RIL หลังทำการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่อุณหภูมิ 20 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่ดีที่สุดในการแสดงออกของโปรตีนทั้ง 4 รูปแบบ ต่อมาจึงได้คัดเลือกสภาวะดังกล่าวมาทำการทำบริสุทธิ์โปรตีนต่อไป โดยทำการผลิตจำนวน 2 ลิตร ต่อโปรตีน 1 รูปแบบโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 2XYT เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนด้วย IPTG แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 20 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วย Ni-NTA bead และทำการชะโปรตีนออกจาก Ni-NTA bead ด้วย elution buffer แล้วนำเอาโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้มาทำการตรวจสอบการแสดงออกด้วยวิธี SDS-PAGE สำหรับโปรตีน VP37(111-281) พบขนาดประมาณ 34 kDa (รูปที่ 4.12A) ซึ่งตรงกับค่าน้ำหนักโมเลกุลของ VP37 (111-281) ตามทฤษฎีที่คำนวณได้จากโปรแกรม ExPASy Bioinformatics Resource Portal คือ 33.96 kD หลังจากการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนพบว่าได้โปรตีนในปริมาณมากใน fraction ที่ 1 -3 (รูปที่ 4.12A) จึงทำการรวมโปรตีนและทำการย้ายโปรตีนมาอยู่ใน PBS buffer pH 8.0 ด้วย PD10 column เพื่อนำโปรตีนที่ได้ไปทำการทดสอบหน้าที่ต่อไป

สำหรับโปรตีน VP37(138-281) พบขนาดประมาณ 30 kDa (รูปที่ 4.12B) ซึ่งตรงกับค่าน้ำหนักโมเลกุลของ VP37(138-281) ตามทฤษฎีที่คำนวณได้จากโปรแกรม ExPASy Bioinformatics Resource Portal คือ 30.96 kDa หลังจากการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนพบว่าได้โปรตีนในปริมาณมากใน fraction ที่ 1 -6 (รูปที่ 4.12B) จึงทำการรวมโปรตีนและทำการย้ายโปรตีนมาอยู่ใน PBS buffer pH 8.0 ด้วย PD10 column เพื่อนำโปรตีนที่ได้ไปทำการทดสอบหน้าที่ต่อไป

สำหรับโปรตีน VP37(1-265) พบขนาดประมาณ 50 kDa (รูปที่ 4.12C) ซึ่งตรงกับค่าน้ำหนักโมเลกุลของ VP37(1-265) ตามทฤษฎีที่คำนวณได้จากโปรแกรม ExPASy Bioinformatics Resource Portal คือ 49.72 kDa หลังจากการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนพบว่าได้โปรตีนในปริมาณมากใน fraction ที่ 1 - 5 จึงทำการรวมโปรตีนและทำการย้ายโปรตีนมาอยู่ใน PBS buffer pH 8.0 ด้วย PD10 column เพื่อนำโปรตีนที่ได้ไปทำการทดสอบหน้าที่ต่อไป

สำหรับโปรตีน VP37(1-250) พบขนาดประมาณ 48 kDa ซึ่งตรงกับค่าน้ำหนักโมเลกุลของ VP37 (1-250) ตามทฤษฎีที่คำนวณได้จากโปรแกรม ExPASy Bioinformatics Resource Portal คือ 47.97 kDa หลังจากการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนพบว่าได้โปรตีนในปริมาณมากใน fraction ที่ 1 - 5

(รูปที่ 4.12D) จึงทำการรวมโปรตีนและทำการย้ายโปรตีนมาอยู่ใน PBS buffer pH 8.0 ด้วย PD10 column เพื่อนำโปรตีนที่ได้ไปทำการทดสอบหน้าที่ต่อไป

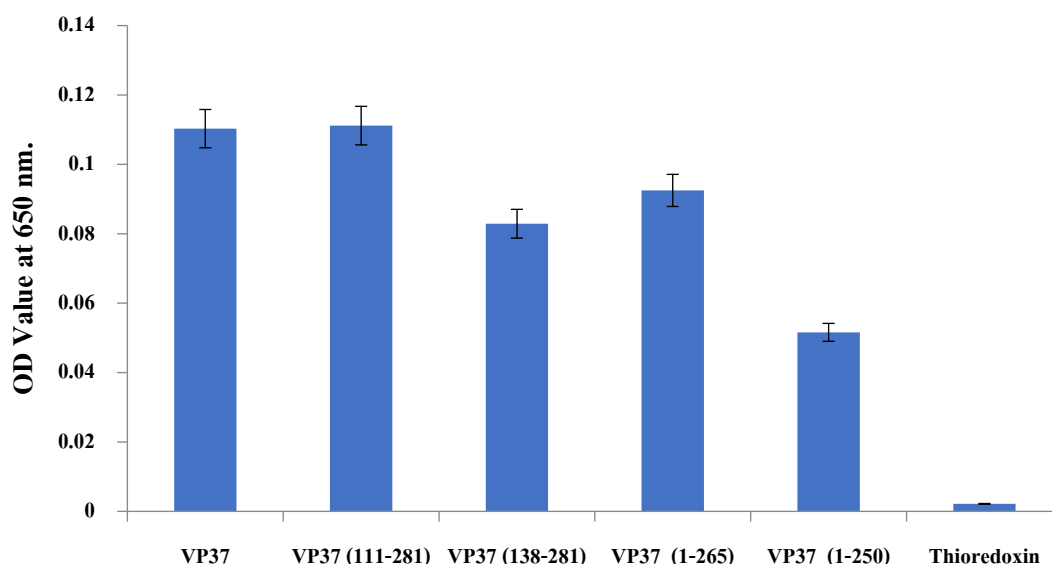


รูปที่ 4.12 ผลการทำบริสุทธิ์โปรตีนรูปแบบต่างๆของโปรตีน VP37 ด้วยเทคนิค Ni-NTA chromatography ผลการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE แสดงจำนวนครั้งที่ทำการชะโปรตีนออกจาก Ni-NTA bead (F1-F5) (A) โปรตีน VP37(111-281) (B) โปรตีน VP37(138-281) (C) โปรตีน VP37(1-265) (D) โปรตีน VP37(1-250) (M คือแถบโปรตีนมาตรฐาน, F(1-5) คือลำดับครั้งที่ทำการชะโปรตีนออกจาก Ni-NTA bead และทำการผสมด้วย native loading dye)

4.4 การทดสอบการจับกันระหว่างรูปแบบต่างๆ ของโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง ด้วยเทคนิค ELISA และ Immunocytochemistry

จากการทดลองในข้อ 4.1.4 แสดงให้เห็นโปรตีน VP37 สามารถจับกับ shrimp hemocyte ได้ ดังนั้นในการทดลองนี้เราจึงสนใจว่าโปรตีน VP37 ในส่วนใดที่สามารถจับกับ shrimp hemocyte ได้ โดยจะทำ

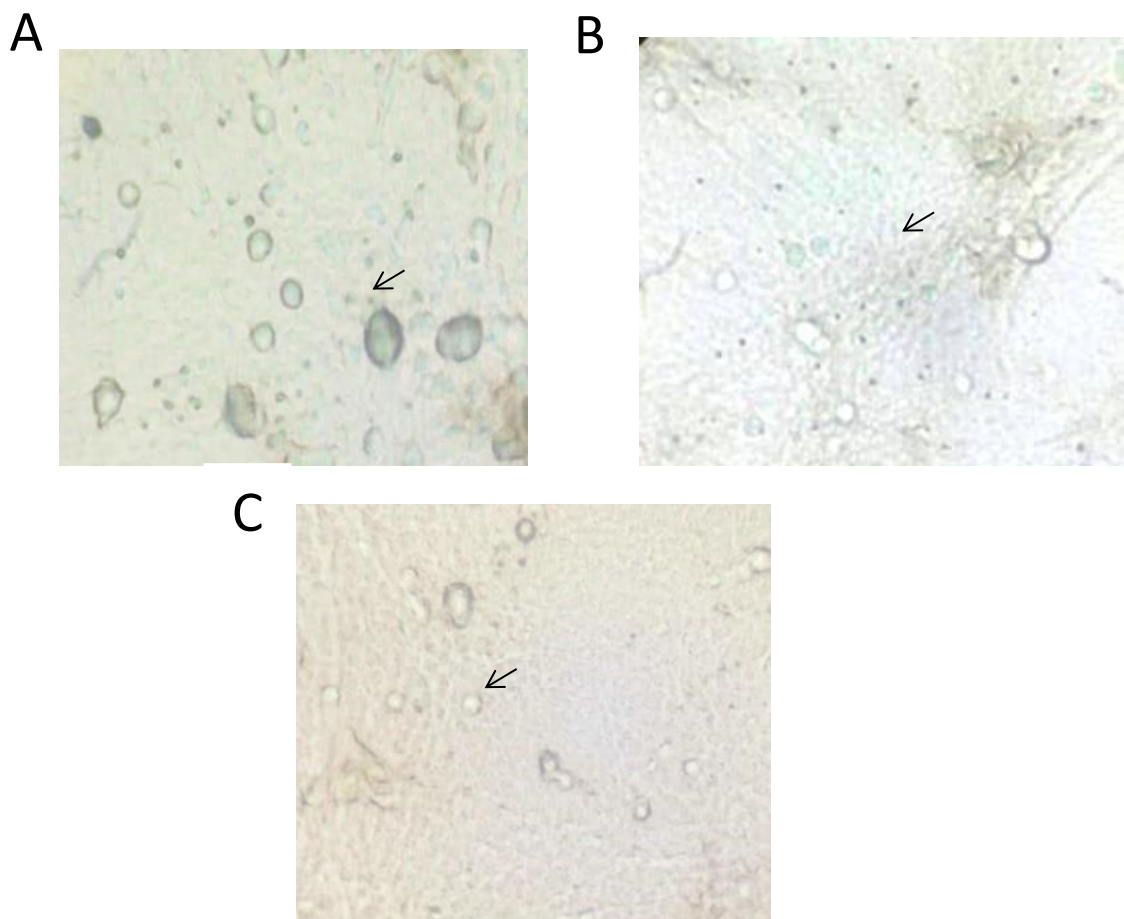
การทดสอบรูปแบบต่างๆ ของโปรตีน VP37 ได้แก่ VP37(111-281), VP37(138-281), VP37(1-265) และ VP37(1-250) และจะใช้โปรตีน Thioredoxin เป็นโปรตีนควบคุมสำหรับการทดลอง ที่ความเข้มข้นโปรตีนเท่ากับ 0.2 mg/ml บ่มกับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งขาว จำนวน 2×10^6 cells จากนั้นทำการล้างเอาโปรตีนที่ไม่จับออกและทำการบ่มกับแอนติบอดี Anti-histidine ที่จำเพาะกับ His-tag ของโปรตีน จากนั้นเติม substrate และทำการตรวจผลการทดลองด้วยการวัดการดูดกลืนแสงที่ OD650 nm. ดังแสดงในรูปที่ 4.13 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีน VP37(138-281) และ VP37(1-250) เป็นส่วนที่ทำให้โปรตีน VP37 มีความสามารถในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งลดลง และพบว่าส่วนของโปรตีนที่ยังสามารถจับกับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งได้ คือ โปรตีน VP37 (111-281) และ VP37(1-265) ซึ่งคือโปรตีน VP37 ที่ครอบคลุมตั้งแต่กรดอะมิโนลำดับที่ 111-265 เป็นตำแหน่งที่ยังคงสามารถจับกับ เซลล์เม็ดเลือดกึ่งขาวได้ ดังนั้นจากการทดลองนี้บ่งชี้ได้ว่าบริเวณ C-terminal domain ตั้งแต่กรดอะมิโน 124-281 มีความสำคัญต่อการเกิดปฏิสัมพันธ์กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่ง เนื่องจากเมื่อทำการพิจารณาผลการทดลองที่แสดงในรูป 4.13 บ่งชี้ได้ว่าเมื่อทำการรบกวนหรือทำลายโปรตีนทางด้าน C-terminal domain จะส่งผลให้ความสามารถในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งลดลงอย่างเห็นได้ชัด แต่อย่างไรก็ตามเมื่อทำการรบกวนหรือทำลายโปรตีนทางด้าน N-terminal domain พบว่าส่งผลกระทบต่อความสามารถในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งเพียงเล็กน้อย ดังนั้นจากการทดลองนี้อาจบ่งชี้ได้ว่าบริเวณทางด้าน C-terminal domain ของโปรตีน VP37 ทำหน้าที่รับผิดชอบต่อการยึดเกาะกับเซลล์เม็ดเลือดกึ่ง



รูปที่ 4.13 ผลการทดสอบการจับกันระหว่างเซลล์เม็ดเลือดกึ่งและโปรตีนรูปแบบต่างๆของโปรตีน VP37 ได้แก่ VP37(111-281), VP37(138-281), VP37(1-265) และ VP37(1-250) และโปรตีน Thioredoxin สำหรับเป็นการทดลองควบคุม ด้วยเทคนิค ELISA

และจากรูปที่ 4.13 จะเห็นได้ว่า VP37(111-281) มีความสามารถในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งได้ใกล้เคียงกับ VP37 ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำโปรตีน VP37(111-281) ไปทำการยืนยันความสามารถในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งด้วยเทคนิค Immunocytochemistry โดยเปรียบเทียบกับโปรตีน VP37 (1-281) ที่ทำหน้าที่เป็น positive control และ Thioredoxin ที่ทำการบ่มกับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งเพื่อทำหน้าที่เป็น negative control จากการทดลองพบว่า โปรตีน VP37 (111-281) ปรากฏสีน้ำเงินบนผิวเซลล์กึ่งเช่นเดียวกับโปรตีน VP37 (1-281) ดังแสดงในรูปที่ 4.14

ดังนั้นผลการทดลองจากทำ ELISA และ Immunocytochemistry สามารถสรุปได้ว่าโปรตีน VP37 มีความสามารถในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งได้ และนอกจากนี้ยังบ่งชี้ได้ว่าบริเวณทางด้าน C-terminal domain ของโปรตีน VP37 ทำหน้าที่รับผิดชอบต่อการเกิดปฏิสัมพันธ์กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่ง

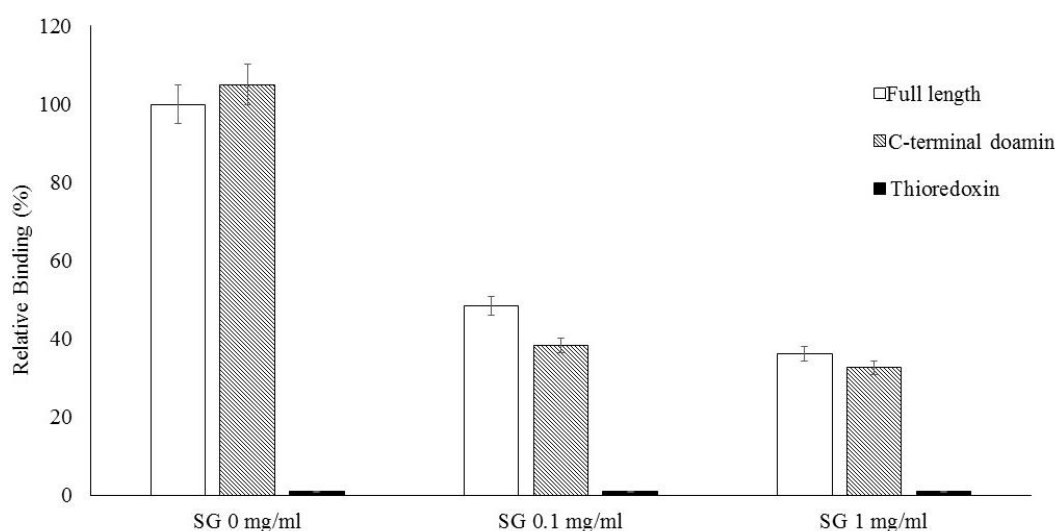


รูปที่ 4.14 การทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37(1-281) และ VP37 (111-281) กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งด้วยเทคนิค Immunocytochemistry. (A) เซลล์เม็ดเลือดกึ่งบ่มกับโปรตีน VP37(1-281) (B) เซลล์เม็ดเลือดกึ่งบ่มกับโปรตีน VP37 (111-281) (C) เซลล์เม็ดเลือดกึ่งบ่มกับ Thioredoxin ทำหน้าที่เป็น negative control

4.5 การทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ Sulfated galactans

4.5.1 การทดสอบความสามารถในการจับขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งด้วย Sulfated galactans

เนื่องจากงานวิจัย Kanokpan และคณะพบว่าสารสกัด Sulfated galactans (SG) จากสาหร่ายสีแดง (*Gracilaria fisheri*) สามารถลดอัตราการตายของกุ้งได้เมื่อทำการฉีดด้วย White spot syndrome virus ที่ทำการ pre-incubate กับ SG ที่ความเข้มข้นต่างๆ (15) และจากงานวิจัยของ Tawut และคณะพบว่า SG สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนหลายชนิดของไวรัสตัวแดงดวงขาวได้จากการทดสอบด้วยเทคนิค Far-Western blot โดยโปรตีนที่น่าสนใจที่พบว่าจะสามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ SG ได้นั้นได้แก่โปรตีน VP28 และโปรตีน VP26 ซึ่งทำหน้าที่เป็นโปรตีนห่อหุ้มของไวรัสตัวแดงดวงขาว (16) จึงเกิดสมมติฐานว่าโปรตีน VP37 ซึ่งเป็นหนึ่งในโปรตีนห่อหุ้มของไวรัสตัวแดงดวงขาวจะสามารถถูกขัดขวางปฏิสัมพันธ์กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งด้วยได้ด้วย SG หรือไม่ ดังนั้นจึงทำการทดสอบความสามารถในการขัดขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งด้วย SG ด้วยเทคนิค ELISA โดยจะทำการบ่มโปรตีน VP37 ทั้งในรูปแบบ Full length และ C-terminal domain ที่ความเข้มข้น 0.2 mg/ml กับ SG ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1 mg/ml เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไปบ่มกับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งและทำการติดตามด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine tag โดยมีสารตั้งต้นเป็น TMB substrate



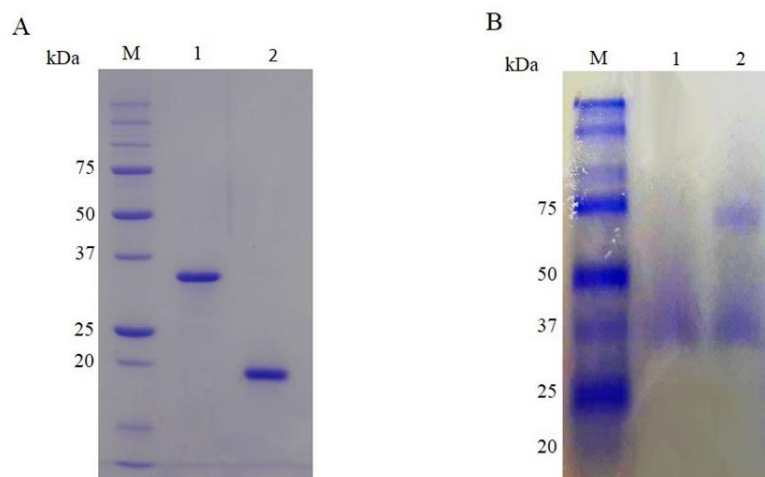
รูปที่ 4.15 การทดสอบความสามารถในการขัดขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งด้วย Sulfated galactans ด้วยเทคนิค ELISA โดยในการทดลองจะทำการบ่มโปรตีน VP37 ทั้งรูปแบบ Full length และ C-terminal domain กับ SG ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1 mg/ml จากนั้นนำไปบ่มกับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งที่ทำการเพาะเลี้ยงบน 96 well-plate แล้วทำการติดตามด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะกับ Histidine tag (anti-His antibody) และทำการตรวจสอบ

ด้วย TMB substrate ก่อนทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ โดยในการทดลองมีโปรตีน Thioredoxin เป็นโปรตีนควบคุม

จากรูปที่ 4.15 พบว่า SG มีความสามารถในการจับขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 รูปแบบ Full length กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่ง โดยความสามารถในการจับขวางจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ SG ที่เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับการจับขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 ในรูปแบบ C-terminal domain จากการทดลองนี้บ่งชี้ได้ว่า SG มีความสามารถในการจับขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่ง ดังนั้นจะทำการทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 รูปแบบ C-terminal domain กับ SG ว่าสามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กันได้โดยตรงหรือไม่ด้วยเทคนิค Native-PAGE

4.5.2 การทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ Glycosaminoglycans ด้วยเทคนิค Native-PAGE

จากการทดลองก่อนหน้านี้พบว่าปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งถูกขัดขวางได้ด้วย SG จึงทำการตรวจสอบการออกฤทธิ์ของ SG ว่า SG ออกฤทธิ์โดยเกิดปฏิสัมพันธ์กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งหรือโปรตีน VP37 ด้วยเทคนิค Native-PAGE โดยในการทดลองนี้จะนำโปรตีน VP37 รูปแบบ C-terminal domain มาทำการตัด Fusion tag ออกด้วยเอนไซม์ TEV protease ดังแสดงในรูปที่ 4.16A จากนั้นจึงนำโปรตีน VP37 ที่ทำการตัด Fusion tag ออกมาทำการบ่มกับ SG ในอัตราส่วน 1:4 โมลาร์ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค Native-PAGE โดยใช้กระแสไฟฟ้า 60 Volt เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าโปรตีน VP37 รูปแบบ C-terminal domain ที่ทำการตัด fusion tag ออกพบว่าโปรตีน VP37 รูปแบบ C-terminal domain พบการเกิดเบนชิฟ (band shift) เกิดขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนที่ไม่ได้ทำการบ่มกับ SG ดังแสดงในรูปที่ 4.16B

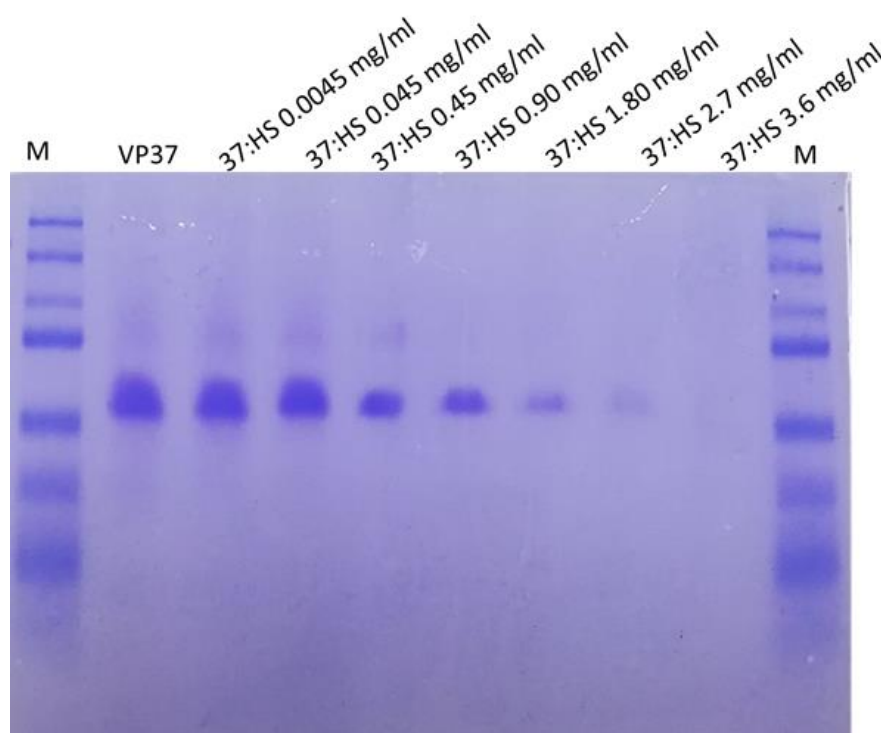


รูปที่ 4.16 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 รูปแบบ C-terminal domain ที่ผ่านการตัด Fusion tag ออก กับ SG ที่อัตราส่วน 1:4 โมลาร์ด้วยเทคนิค Native-PAGE โดยใช้กระแสไฟฟ้า 60 Volt เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง แล้วทำการย้อมด้วย Coomassie stain เพื่อติดตามแบนโปรตีนที่เกิดขึ้น โดยรูป A แสดงโปรตีน VP37 รูปแบบ C-terminal domain ที่ทำการตัด Fusion tag เลข 1 แสดงโปรตีน VP37 รูปแบบ C-terminal domain ที่มี Fusion tag และเลข 2 แสดงโปรตีน VP37 รูปแบบ C-terminal domain ที่ไม่มี Fusion tag และรูป B แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 รูปแบบ C-terminal domain ที่ผ่านการตัด Fusion tag ออก กับ SG โดยเลข 1 แสดงโปรตีน VP37 รูปแบบ C-terminal domain ที่ไม่ได้ทำการบ่มกับ SG และเลข 2 แสดงโปรตีน VP37 ที่ทำการบ่มกับ SG ที่อัตราส่วน 1:4 โมลาร์

ดังนั้นจากการทดลองนี้บ่งชี้ได้ว่า SG สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์ได้โดยตรงกับโปรตีน VP37 รูปแบบ C-terminal domain จากการทดลองบ่งชี้ได้ว่า SG มีความสามารถในการขัดขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 ทั้งในรูปแบบ Full length และ C-terminal domain โดยการออกฤทธิ์ของ SG อาจจะมีเป้าหมายที่บริเวณ C-terminal domain ของโปรตีน VP37 จึงส่งผลให้ความสามารถในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งลดลงเมื่อความเข้มข้นของ SG ที่เพิ่มขึ้น

ดังนั้นจากข้อมูลข้างต้นจึงเกิดสมมติฐานว่าบนผิวเซลล์กึ่งอาจจะมีโมเลกุลที่มีลักษณะคล้ายกับ SG (SG-like molecule) ส่งผลให้เมื่อทำการนำโปรตีน VP37 ไปทำการบ่มกับ SG แล้วทำให้ SG มีความสามารถในการยับยั้งปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งจากสมมติฐานนี้จึงได้ทำการสืบค้นข้อมูลเพิ่มเติมพบว่ามีรายงานการพบสารจำพวกไกลโคซามิโนไกลแคนบนกึ่ง ได้แก่ Heparin-like molecule และ Heparan sulfate จากกึ่ง (21) ซึ่งเป็นสารที่มีหมู่ซัลเฟตเป็นส่วนประกอบจำนวนมาก ดังนั้นจึงทำการทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ Heparin ด้วยเทคนิค Native-PAGE เพื่อเป็นการทดสอบการปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 รูปแบบ Full length

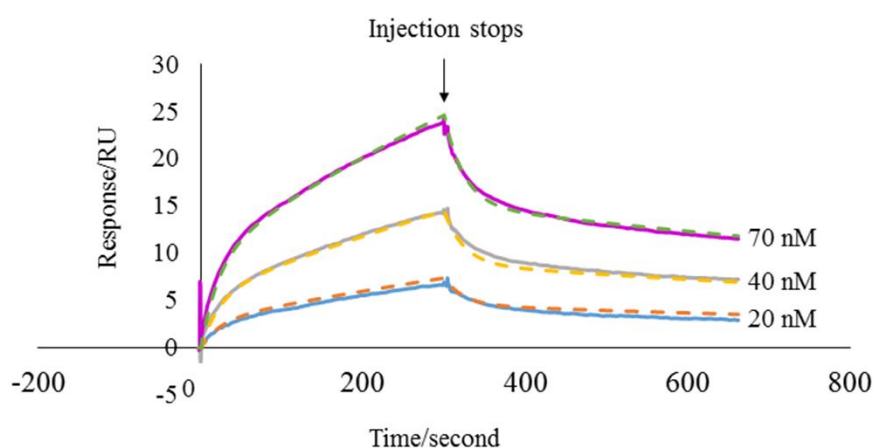
กับ Heparin โดยจะทำการบ่มโปรตีน VP37 ในรูปแบบ Full length ที่ทำการตัด Fusion tag ออกด้วย TEV protease กับ Heparin ที่ความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนนำมาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Native-PAGE จากการทดลองพบว่าเมื่อทำการบ่มโปรตีน VP37 กับ Heparin จะเห็นได้ว่าความเข้มของแบนโปรตีนที่ทำการย้อมเจดด้วย Coomassie stain นั้นมีความเข้มข้นลดลงเรื่อยๆตามความเข้มข้นของ Heparin ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจบ่งชี้ได้ว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Heparin ส่งผลให้มีหมู่ซัลเฟตเพิ่มขึ้นจึงมีความสามารถในการจับกับโปรตีน VP37 เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากงานวิจัยของ Tawut และคณะพบว่าหมู่ซัลเฟตของ SG นั้นมีความสำคัญต่อการเกิดปฏิสัมพันธ์ของไวรัสตัวแดงดวงขาว (16) และเมื่อทำการติดตามด้วย Coomassie stain ที่สามารถย้อมติดโปรตีนได้นั้นจึงทำให้เห็นความเข้มของแบนโปรตีนค่อยๆลดลงตามลำดับ ซึ่งอาจเกิดจากเมื่อโปรตีน VP37 มีความสามารถในการจับกับ Heparin ส่งผลให้ VP37-Heparin complex นั้นมีขนาดใหญ่จนไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านเจลได้ดังแสดงในรูปที่ 4.17



รูปที่ 4.17 ผลการทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ Heparin ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยเทคนิค Native-PAGE โดยทำการนำโปรตีน VP37 รูปแบบ Full length มาทำการตัด Fusion tag ออก จากนั้นนำโปรตีนที่ได้มาทำการบ่มกับ Heparin ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมาทำการแยกโปรตีนตามขนาดด้วยเทคนิค Native-PAGE โดยจะใช้กระแสไฟฟ้า 60 Volt เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำการย้อมสี Coomassie blue เพื่อดูแบนโปรตีนที่เกิดขึ้น

4.5.3 การทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ Heparin ด้วยเทคนิค Surface Plasmon resonance (SPR)

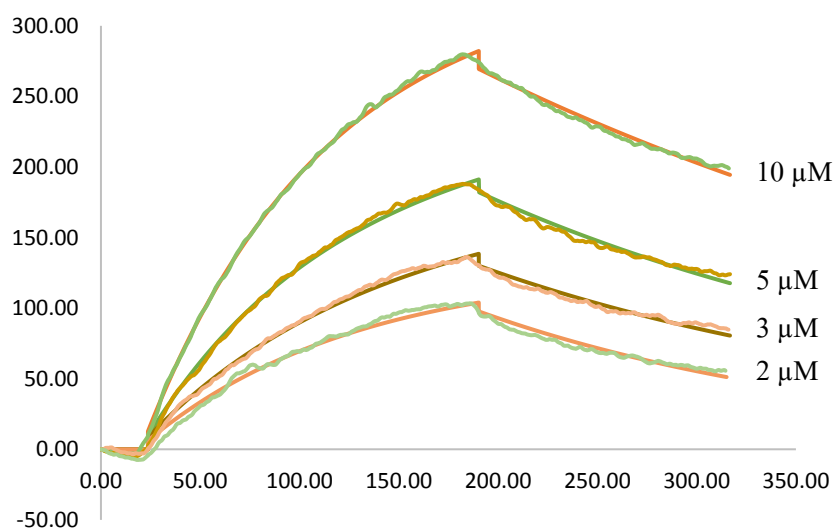
จากการทดสอบด้วยเทคนิค Native-PAGE พบว่าโปรตีน VP37 สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ Heparin ได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงต้องการยืนยันปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 ทั้งในรูปแบบ Full length และ C-terminal domain กับเฮปารินด้วยเทคนิค Surface Plasmon Resonance (SPR) เนื่องจากเทคนิค SPR เป็นเทคนิคที่สามารถติดตามการเกิดปฏิสัมพันธ์ได้แบบ real time และสามารถคำนวณค่า binding affinity (K_D) ซึ่งเป็นค่าที่ใช้รายงานความสามารถในการจับกันของ โมเลกุล 2 ชนิดได้อีกด้วย โดยจะทำการตรึง Heparin บนผิวหน้า SA chip จากนั้นจะทำการฉีดโปรตีน VP37 รูปแบบ Full length และ C-terminal domain ที่ทำการตัด Fusion tag โปรตีนออกด้วย TEV protease ที่ความเข้มข้นต่างๆผ่านผิวหน้า SA chip จากนั้นทำการวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นด้วย โปรแกรม BIAevaluation software (version 2.0) โดยจะทำ Data fitting แบบ Heterogeneous ligand model ซึ่งจากการทดลองพบว่าโปรตีน VP37 รูปแบบ Full length สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ Heparin ได้แบบ Does dependent (รูปที่ 4.18) กล่าวคือเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีน VP37 ส่งผลให้ค่าความสามารถในการจับกับ Heparin เพิ่มขึ้นตามลำดับ และเมื่อคำนวณค่าการจับกันระหว่างโปรตีน VP37 รูปแบบ Full length กับ Heparin ด้วยโปรแกรมพบว่าโปรตีน VP37 ในรูปแบบ Full length มีค่า Binding affinity ที่ $1.0 \mu\text{M}$ ซึ่งจากการทดลองนี้บ่งชี้ได้ว่าโปรตีน VP37 รูปแบบ Full length สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ Heparin ได้



รูปที่ 4.18 ผลการทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ Heparin ด้วยเทคนิค Surface Plasmon Resonance. โดยทำการตรึง porcine heparin บนผิวหน้า SA-chip จากนั้นทำการฉีดโปรตีน VP37 ที่ความเข้มข้น 20, 40 และ 70 nM แล้วดูค่า Respond unit (RU) ที่เกิดขึ้นของแต่ละ

ความเข้มข้น จากนั้นทำการ Regenerated ผิวหน้า SA-chip ด้วย 5M NaCl แล้วนำข้อมูลที่ได้มาเข้าสู่สมการทางคณิตศาสตร์ (Fitting) ด้วยโปรแกรม BIA evaluation software ver. 2.0 แบบ Heterogeneous ligand model จากการทดลองพบว่าค่าความสามารถในการจับ (Binding affinity, K_D) กันของโปรตีน VP37 กับ porcine heparin มีค่าเท่ากับ 1.0 μM

เมื่อทำการนำส่วน C-terminal domain มาทำการทดสอบความสามารถในการจับกับ Heparan sulfate ด้วยเทคนิค SPR โดยทำการฉีดโปรตีน VP37 รูปแบบ C-terminal domain ที่ความเข้มข้น 2, 3, 5 และ 10 μM พบว่าโปรตีน VP37 รูปแบบ C-terminal domain สามารถจับกับ Heparin ที่ถูกตรึงอยู่บนผิวหน้า SA chip ได้ โดยความสามารถในการจับจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของโปรตีน VP37 รูปแบบ C-terminal domain ดังแสดงในรูปที่ 4.18 และเมื่อคำนวณค่าการจับกันระหว่างโปรตีน VP37 กับ Heparin ด้วยโปรแกรมพบว่าโปรตีน VP37 รูปแบบ C-terminal domain กับ Heparin มีค่า Binding affinity ที่ 2.44 μM ซึ่งจากการทดลองนี้บ่งชี้ได้ว่าโปรตีน VP37 รูปแบบ C-terminal domain สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ Heparin ได้



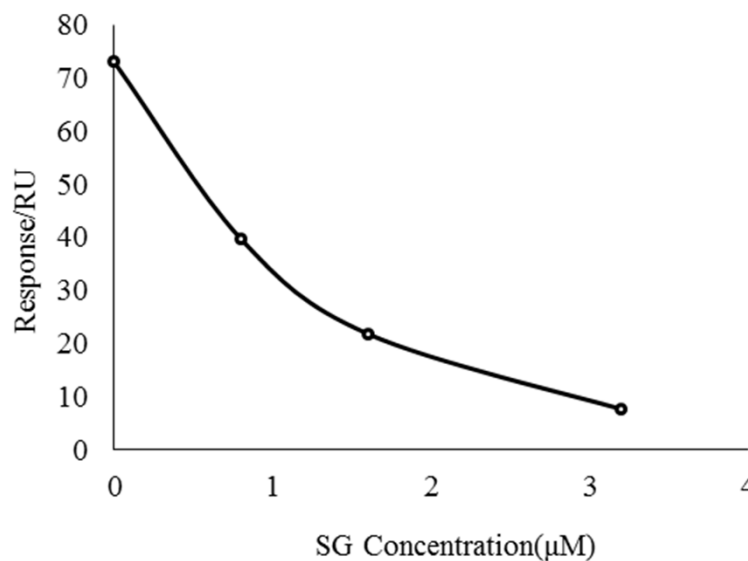
รูปที่ 4.19 ผลการทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 รูปแบบ C-terminal domain กับ Heparin ด้วยเทคนิค Surface Plasmon Resonance. โดยทำการตรึง porcine heparin บนผิวหน้า SA-chip จากนั้นทำการฉีดโปรตีน VP37 ที่ความเข้มข้น 2, 3, 5 และ 10 μM แล้วดูค่า Respond unit (RU) ที่เกิดขึ้นของแต่ละความเข้มข้น จากนั้นทำการ Regenerated ผิวหน้า SA-chip ด้วย 5M NaCl แล้วนำข้อมูลที่ได้มาเข้าสู่สมการทางคณิตศาสตร์ (Fitting) ด้วยโปรแกรม BIA evaluation software ver. 2.0 แบบ Heterogeneous ligand model จากการทดลองพบว่า

ค่าความสามารถในการจับ (Binding affinity, K_D) กันของโปรตีน VP37 กับ porcine heparin มีค่าเท่ากับ 2.44 μM

ซึ่งจากการทดลองนี้บ่งชี้ได้ว่าโปรตีน VP37 ทั้งในรูปแบบ Full length และ C-terminal domain สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ Heparin ได้ และค่า Binding affinity ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกัน โดย Full length และ C-terminal domain มีค่า Binding affinity ที่ 1.0 μM และ 2.44 μM ตามลำดับ จึงอาจบ่งชี้ได้ว่าการยึดเกาะของโปรตีน VP37 นั้นอาศัยส่วนที่เป็น C-terminal domain และปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากการเข้าจับกันของโปรตีน VP37 ทางด้าน C-terminal domain กับ Heparin

4.6 การทดสอบการขัดขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ Heparin ด้วย Sulfated galactans (SG) ด้วยเทคนิค Surface Plasmon Resonance (SPR)

ในขณะนี้ทราบแล้วว่าโปรตีน VP37 นั้นสามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งได้ และปฏิสัมพันธ์นี้ถูกขัดขวางได้ด้วย SG และนอกจากนี้เรายังทราบอีกว่าโปรตีน VP37 สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ Heparin ได้ ดังนั้นจึงเกิดสมมติฐานว่าการออกฤทธิ์ของ SG ในการขัดขวางปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งนั้นใช่ขัดขวางที่ปฏิสัมพันธ์นี้หรือไม่ ดังนั้นจึงทำการทดสอบสมมติฐานนี้ด้วยเทคนิค Surface Plasmon Resonance โดยทำการบ่มโปรตีน VP37 ที่ทำการตัด Fusion tag ออกด้วย TEV protease กับ SG ที่ความเข้มข้นต่างๆก่อนนำไปฉีดผ่านผิวหน้า SA chip ที่ทำการตรึง Heparin จากการทดลองพบว่า SG มีความสามารถในการขัดขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ Heparin แบบ Does dependent ดังแสดงในรูปที่ 4.20 กล่าวคือเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ SG ส่งผลให้ความสามารถในการจับของโปรตีน VP37 กับ Heparin ลดลงตามลำดับ



รูปที่ 4.20 ผลการทดสอบความสามารถในการจับขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ porcine heparin ด้วย Sulfated galactans (SG) ด้วยเทคนิค Surface Plasmon Resonance. ทำการบ่มโปรตีน VP37 กับ SG ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการนำโปรตีนที่ได้มาฉีดผ่านผิวหน้า SA-Chip ที่ทำการตรึง porcine heparin แล้วดูค่า Respond unit (RU) ที่เกิดขึ้นของแต่ละความเข้มข้น จากนั้นทำการ Regenerated ผิวหน้า SA-chip ด้วย 5M NaCl จากการทดลองพบว่า SG มีความสามารถในการจับขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ porcine heparin แบบ Does-dependent

จากการทดลองนี้บ่งชี้ได้ว่าการออกฤทธิ์ของ SG ต่อการจับขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งนั้นออกฤทธิ์ที่ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ Heparin ดังนั้นจากการทดลองนี้อาจสรุปได้ว่าโปรตีน VP37 อาจจะใช้ Heparin เป็นโมเลกุลตัวรับ (receptor) ในการยึดเกาะกับเซลล์กึ่ง

4.7 การตกผลึกโปรตีน VP37

นอกจากนี้ทางคณะผู้วิจัยได้ลองทำการตกผลึกโปรตีน VP37 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่จะทำให้เกิดผลึกของโปรตีน VP37 โดยจะทำการหาบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการเกิดผลึกของโปรตีน VP37 โดยใช้ Nextal Tubes Suites (QIAGEN) ภายใต้อากาศ parafilm oil มาทำการทดสอบ โดยจะทำการเติม 30 μl parafilm oil ใน oil crystallization plate จากนั้นทำการเติม 1 μl VP37 และ 1 μl crystallization buffer บน parafilm oil แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C ซึ่งจากการทดลองพบว่ามีแนวโน้มที่โปรตีน VP37 ซึ่งจากการทดสอบด้วยบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ พบว่าบัฟเฟอร์ B3 (0.1 M Na acetate pH 4.6, 30% (v/v) MPD, 0.02 M Ca Chloride) สามารถเกิดการตกผลึกของโปรตีน VP37 ได้ เมื่อเทียบกับการตก

ผลึกด้วยบัฟเฟอร์ C7 (2M Ammonium sulfate) และ D10 (0.1M HEPES, 0.8M Sodium phosphate, 0.8M Potassium phosphate) ดังแสดงในรูปที่ 4.21



A

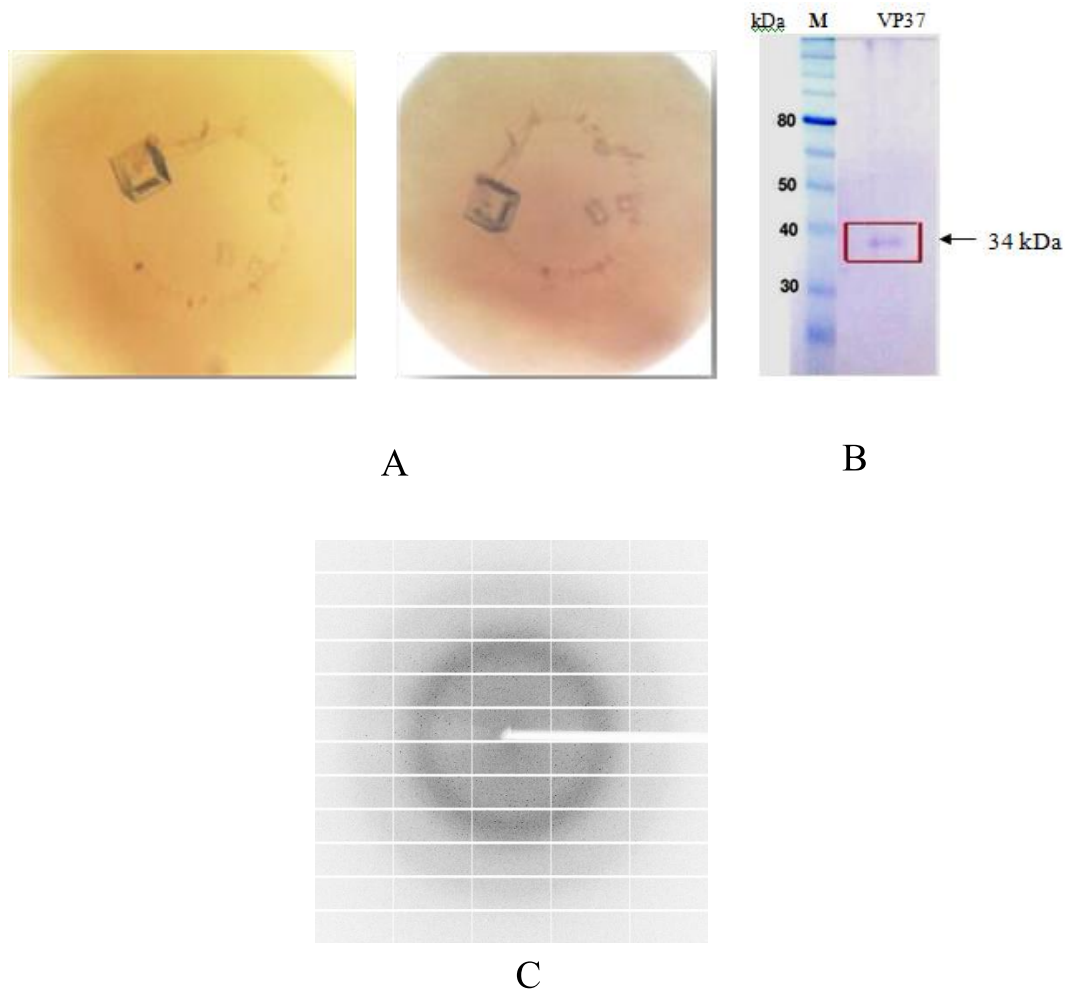
B

C

รูปที่ 4.21 ผลการหาบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการตกผลึกของโปรตีน VP37 ด้วย Nextal Tubes Suites (QIAGEN) ภายใต้ parafilm oil โดยรูป A แสดงถึงผลึกของโปรตีน VP37 ที่ทำการตกผลึกด้วยบัฟเฟอร์ B3 (0.1 M Na acetate pH 4.6, 30% (v/v) MPD, 0.02 M Ca Chloride) รูป B แสดงถึงผลึกของโปรตีน VP37 ที่ทำการตกผลึกด้วยบัฟเฟอร์ C7 (2M Ammonium sulfate) และรูป C แสดงถึงผลึกของโปรตีน VP37 ที่ทำการตกผลึกด้วยบัฟเฟอร์ D10 (0.1M HEPES, 0.8M Sodium phosphate, 0.8M Potassium phosphate) ตามลำดับ

ดังนั้นจึงทำการนำบัฟเฟอร์ B3 (0.1 M Na acetate pH 4.6, 30% (v/v) MPD, 0.02 M Ca Chloride) มาทำการตกผลึกโปรตีนอีกครั้ง โดยเทียบกับบัฟเฟอร์ที่ไม่มีการเติมโปรตีน VP37 เพื่อทำการยืนยันว่าผลึกที่เกิดขึ้นนั้นเป็นผลึกของโปรตีน VP37 ซึ่งจากการทดสอบพบว่าบัฟเฟอร์ที่ไม่ได้ทำการเติมโปรตีน VP37 นั้นไม่สามารถเกิดผลึกได้ (รูปที่ 4.22A) และเมื่อนำผลึกที่ได้ไปทำการทดสอบด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่ามีขนาดประมาณ 34 kDa ซึ่งเป็นขนาดของโปรตีน VP37 ที่ทำการตัด fusion tag ออก ดังนั้นจากการทำ SDS-PAGE สามารถยืนยันได้ว่าผลึกโปรตีนที่เกิดขึ้นนั้นเป็นผลึกของโปรตีน VP37 ดังแสดงในรูปที่ 4.22B ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะทำการยืนยันผลึกที่เกิดขึ้นเป็นผลึกของโปรตีน VP37 ด้วยเทคนิค X-ray diffraction เพื่อดูลักษณะของ Diffraction pattern ที่เกิดขึ้นดังแสดงในรูป 4.22C ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า diffraction pattern ที่เกิดขึ้นเกิดจากผลึกของโปรตีน เนื่องจากลักษณะของ diffraction spot อยู่ใกล้กันบ่งชี้ได้ว่า unit cell มีขนาดใหญ่ ซึ่งเกิดจากการรวมตัวกันของ macromolecule ของโปรตีน ซึ่งจะส่งผลให้เมื่อทำการยิงแสงซินโครตรอนไปยังผลึกจะทำให้เกิดการกระจายตัวของ diffraction spot ที่อยู่ใกล้ชิดกัน แต่ในขณะที่เป็นผลึกของเกลือจะทำให้

เกิด diffraction pattern ที่อยู่ห่างกันเนื่องจากเกิดการรวมตัวของผลึกเกลือซึ่งอยู่ใกล้ชิดกันจึงส่งผลให้เมื่อทำการยิงแสงซินโครตรอนไปยังผลึกจะทำให้เกิดการกระจายตัวของ diffraction spot



รูปที่ 4.22 ผลการทดสอบผลึกของโปรตีน VP37 ที่ตกผลึกได้ด้วยบัฟเฟอร์ B3 (0.1 M Na acetate pH 4.6, 30% (v/v) MPD, 0.02 M Ca Chloride) โดยรูป A แสดงผลการทดสอบการตกผลึกของโปรตีน VP37 ด้วยบัฟเฟอร์ B3 (0.1 M Na acetate pH 4.6, 30% (v/v) MPD, 0.02 M Ca Chloride) รูป B แสดงผลการทดสอบผลึกโปรตีนที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค SDS-PAGE และรูป C การทำ X-ray diffraction ของผลึกโปรตีน VP37

ดังนั้นจากการทดลองนี้บ่งชี้ได้ว่าเราสามารถหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตกผลึกของโปรตีน VP37 ได้สำเร็จ ซึ่งจากองค์ความรู้นี้สามารถนำไปทำนายรูปร่าง และลักษณะโครงสร้างของโปรตีน VP37 ในเชิงลึกได้เพิ่มมากยิ่งขึ้น ซึ่งจะช่วยให้เกิดความเข้าใจอันดีต่อโปรตีน VP37 เพิ่มมากยิ่งขึ้น

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง

5.1 การศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่ง

เนื่องจากโปรตีน VP37 เป็นหนึ่งในโปรตีนห่อหุ้มที่สำคัญของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่มีการรายงานความสามารถในการเกิดปฏิสัมพันธ์กับเซลล์กึ่งได้ โดยงานวิจัยของ Q. H.- Liu และคณะ ทำการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 ที่ทำการผลิตในระบบ *E.coli* และทำบริสุทธิ์ด้วยบัฟเฟอร์ที่มีส่วนผสมของ guanidine โดย guanidine จะทำหน้าที่เป็นสารทำลายโครงสร้างและทำให้เกิดการเสียสภาพ (denature) ของสารโมเลกุลใหญ่ ยกตัวอย่างเช่น โปรตีน และกรดนิวคลีอิก โดยทำลายที่พันธะไฮโดรเจน (56) จากนั้นทำการ refolding โปรตีนโดยการลดความเข้มข้นของ guanidine แล้วนำโปรตีนที่ได้ไปทำการทดสอบความสามารถในการจับกับ gill membrane protein ของกึ่งด้วยเทคนิค VOPBA จากการทดลองพบว่าโปรตีน VP37 มีความสามารถในการเกิดปฏิสัมพันธ์กับ gill membrane protein ของกึ่งได้ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงคุณภาพโปรตีนพบว่าในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์โปรตีน บัฟเฟอร์ที่นำมาใช้มีส่วนผสมของ guanidine แต่ถึงแม้ว่าจะมีการทำ refolding โปรตีนเพื่อให้โปรตีนมีการจัดเรียงรูปร่างตามเดิมแต่ก็ยังไม่มีความสามารถพิสูจน์หรือยืนยันได้ว่าโปรตีนที่ผ่านการทำ refolding สามารถฟอร์มรูปร่างโปรตีนที่ถูกต้องได้ นอกจากนี้ถ้าทำการพิจารณาถึงเทคนิคที่ใช้ในการทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ gill membrane protein พบว่าเทคนิคที่ทางผู้วิจัยนำมาทดสอบอาจส่งผลกระทบต่อรูปร่างโปรตีนได้ เนื่องจากในขั้นตอนการตรวจสอบด้วยเทคนิค VOPBA มีขั้นตอนการทำ SDS-PAGE ซึ่งเป็นเทคนิคที่ทำให้โปรตีนเกิดการคลายตัวเป็นเส้นตรง เนื่องจากการทำงานของสาร SDS ก่อนจะนำไปทดสอบกับ gill membrane protein ซึ่งขั้นตอนการแยกขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ทำให้โปรตีนที่ได้มีรูปร่างเป็นเส้นตรงอาจส่งผลให้บริเวณที่อยู่ด้านในของโปรตีนคลายออกและมีโอกาสสัมผัสกับ gill membrane protein ของกึ่งซึ่งในสภาวะธรรมชาติที่โปรตีนมีการจัดเรียงรูปร่างอย่างถูกต้องอาจจะไม่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ gill membrane protein ของกึ่งได้ (9) นอกจากนี้ยังมีนักวิจัยอีกหลายกลุ่มสนใจทำการศึกษาเกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์กึ่ง แต่อย่างไรก็ตามการทดลองก่อนหน้านี้สามารถสรุปได้เป็นข้อบ่งชี้ที่มีแนวโน้มความเป็นไปได้เท่านั้น เนื่องจากในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์หรือเทคนิคที่นำมาใช้ในการทดสอบยังคงสนับสนุนให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีน (8 – 9, 48 - 49) แต่อย่างไรก็ตามในปี 2006 Liu Qing-hui และคณะ ได้ทำการผลิตโปรตีน VP37 ในระบบยีสต์ (*Pichia Pastoris*) และทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคที่ไม่สนับสนุนให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีน จากนั้นนำโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้มาทำการทดสอบความสามารถในการเกิดปฏิสัมพันธ์กับเซลล์กึ่งด้วยเทคนิค ELISA และ Fluorescent microscopy พบว่าโปรตีน VP37 ที่ผลิตในระบบยีสต์สามารถเกิด

ปฏิสัมพันธ์กับเซลล์กึ่งได้ (50) แต่อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าขั้นตอนการทำบริสุทธิ์โปรตีนรวมถึงเทคนิคที่นำมาใช้ในการทดสอบปฏิสัมพันธ์จะไม่สนับสนุนให้เกิดการเสถียรภาพของโปรตีน แต่ยังคงขาดหลักฐานการยืนยันคุณภาพโปรตีนที่ผลิตได้ ยกตัวอย่างเช่น การตรวจสอบด้วยเทคนิค Native-PAGE หรือเทคนิค Gel filtration ดังนั้นนางสาวอัญชลี สาลีอาจ จึงสนใจที่จะทำการศึกษาความสามารถในการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์กึ่งได้ในสภาวะธรรมชาติโดยควบคุมคุณภาพโปรตีน และทำการทดสอบด้วยเทคนิคที่ไม่สนับสนุนให้โปรตีนเกิดการเสถียรภาพ โดยทำการทดสอบปฏิสัมพันธ์ดังกล่าวโดยการทำบริสุทธิ์โปรตีน VP37 ด้วย Ni-NTA affinity chromatography โดยใช้บัฟเฟอร์ที่ไม่มีองค์ประกอบที่สนับสนุนให้โปรตีนเกิดการเสถียรภาพเช่น Guanidine หรือ Urea พบว่าสามารถผลิตและทำบริสุทธิ์โปรตีน VP37 ให้อยู่ในรูปละลายน้ำ (soluble protein) จากนั้นจึงทำการตรวจสอบคุณภาพโปรตีนด้วยเทคนิค Gel filtration พบว่ากราฟ sensogram ที่ได้มีลักษณะเป็น symmetric peak บ่งชี้ได้ว่าโปรตีนที่ผลิตได้ มีรูปร่างแบบเดียวกันนั้นจากการตรวจสอบคุณภาพโปรตีนด้วยเทคนิค Gel filtration บ่งชี้ได้ว่าผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการผลิตโปรตีน VP37 ให้อยู่ในรูปธรรมชาติ และเมื่อนำโปรตีนที่ผลิตได้ มาทำการทดสอบความสามารถในการเกิดปฏิสัมพันธ์กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งด้วยเทคนิค ELISA พบว่าโปรตีน VP37 สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งได้ และนอกจากนี้นางสาวอัญชลี สาลีอาจ ได้ทำการศึกษาโครงสร้างของโปรตีน VP37 ในระดับปฐมภูมิพบว่าโปรตีน VP37 สามารถแบ่งได้เป็น 3 ส่วน ได้แก่ส่วนที่เป็น N-terminal domain โดยจะครอบคลุมตั้งแต่กรดอะมิโนที่ 1 ถึงกรดอะมิโนที่ 104 ส่วนที่สองได้แก่ส่วนที่เรียกว่า Flexible regions ซึ่งจะรับผิดชอบตั้งแต่กรดอะมิโนที่ 105 ถึงกรดอะมิโนที่ 123 และส่วนที่สามจะเรียกว่าส่วน C-terminal domain จะรับผิดชอบตั้งแต่กรดอะมิโนที่ 124 ถึงกรดอะมิโนที่ 281 จากโครงสร้างปฐมภูมิทำให้ผู้วิจัยทำการศึกษหาบริเวณที่สำคัญที่ทำหน้าที่รับผิดชอบต่อการยึดเกาะของโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่ง โดยทำการตัดโปรตีน VP37 ออกเป็นส่วนต่างๆ (Truncate) แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการเกิดปฏิสัมพันธ์กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งด้วยเทคนิค ELISA จากการทดลองพบว่าเมื่อทำลายหรือมีการกระทบกับส่วน C-terminal domain ของโปรตีน VP37 จะส่งผลให้ความสามารถในการเกิดปฏิสัมพันธ์กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญ จากงานวิจัยนี้บ่งชี้ได้ว่าโปรตีน VP37 อาจจะอาศัยส่วนที่เป็น C-terminal domain ในการยึดเกาะกับเซลล์เม็ดเลือดกึ่ง และจากผลการทดลองนี้ยังสามารถบ่งชี้ได้ว่าการจัดเรียงตัวของโปรตีน VP37 เพื่อทำการจัดตำแหน่งในการยึดเกาะกับเซลล์เม็ดเลือดกึ่ง (haemocyte-binding site) จะเกิดการเรียงตัวโดยโปรตีน VP37 จะเกิดเป็นก้อนโปรตีน 2 ก้อนที่เชื่อมกันด้วยส่วนที่เรียกว่า Flexible region โดยโปรตีนก้อนแรกเกิดจากส่วนที่เป็น N-terminal domain และโปรตีนก้อนที่สองเกิดจากส่วนที่เป็น C-terminal domain ดังนั้นจากการทดลองของนางสาวอัญชลี สาลีสรุปได้ว่าโปรตีน VP37 ที่เป็นหนึ่งในโปรตีนห่อหุ้มของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่มีความสามารถในการเกิดปฏิสัมพันธ์กับเซลล์กึ่งได้ โดยปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นอาศัยส่วนที่เป็น C-terminal domain ในการรับผิดชอบต่อการยึดเกาะของโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่ง (52)

ต่อมาในปี 2013 Kanokpan และคณะ รายงานความสามารถของสารสกัด Sulfated galactans (SG) จากสาหร่ายสีแดง (*Gracilaria fisheri*) ต่อการขัดขวางการบุกรุกเข้าสู่เซลล์กึ่งของไวรัสตัวแดงดวงขาว (15) ต่อมาในปี 2014 Tawut และคณะรายงานปฏิสัมพันธ์ระหว่างไวรัสตัวแดงดวงขาวกับ Sulfated galactans อาศัยหมุ้ซัลเฟตเป็นองค์ประกอบสำคัญ และจากการทดสอบด้วยเทคนิค Far-Western blot พบว่า SG มีความสามารถในการจับกับโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาวได้หลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น VP26 และ VP28 ซึ่งเป็นหนึ่งในโปรตีนห่อหุ้มของไวรัสตัวแดงดวงขาว (16) ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการศึกษาความสามารถในการขัดขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งด้วย SG เนื่องจากโปรตีน VP37 เป็นหนึ่งในโปรตีนห่อหุ้มของไวรัสตัวแดงดวงขาวแต่จากรายงานของ Tawut และคณะไม่มีการรายงานปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ SG ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเทคนิคที่ใช้ในการทดสอบนั้นอาจทำให้โปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาวเกิดการเสียสภาพและไม่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ SG ได้ ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงจะทำการทดสอบความสามารถในการขัดขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งด้วย SG โดยเริ่มจากการผลิตโปรตีน VP37 ทั้งในรูปแบบ Full length และ C-terminal domain ในระบบ *E.coli* และทำการตรวจสอบคุณภาพโปรตีนที่ผลิตได้ด้วยเทคนิค Gel filtration รวมถึงการตรวจสอบความสามารถของโปรตีนที่ผลิตได้ในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งด้วยเทคนิค ELISA ซึ่งจากการทดลองพบว่าโปรตีน VP37 ทั้งรูปแบบ Full length และ C-terminal domain ที่ผลิตได้มีขนาด 48 kDa และ 33 kDa ตามลำดับ และเมื่อนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค Gel filtration พบว่าปรากฏรูปแบบ sensogram ที่มีลักษณะเป็น symmetric peak แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่ผลิตได้มีรูปร่างในลักษณะเดียว และมีความเสถียรในสารละลาย และเมื่อทำการทดสอบความสามารถในการเกิดปฏิสัมพันธ์กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งพบว่าโปรตีน VP37 ที่ผลิตได้ยังคงความสามารถในการเกิดปฏิสัมพันธ์กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งได้เช่นเดียวกับการทดลองของนางสาวอัญชลี สาลีอาจ (52) ดังนั้นจากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าโปรตีน VP37 ทั้งรูปแบบ Full length และ C-terminal domain ที่ผลิตได้มีความสามารถในการเกิดปฏิสัมพันธ์กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่ง และสามารถนำไปใช้ในการทดลองต่อไปได้

5.2 การศึกษาความสามารถในการขัดขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งด้วย Sulfated galactans

จากงานวิจัยของ Kanokpan และคณะพบว่าสารสกัด Sulfated galactans (SG) จากสาหร่ายสีแดง (*Gracilaria fisheri*) มีความสามารถในการขัดขวางการบุกรุกของไวรัสตัวแดงดวงขาว (15) ต่อมาในปี 2014 กลุ่มวิจัยของ Tawut และคณะรายงานว่าหมุ้ซัลเฟตที่เป็นองค์ประกอบหลักของ SG ทำหน้าที่รับผิดชอบในการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างไวรัสตัวแดงดวงขาวกับ SG และนอกจากนี้ยังรายงานว่า SG สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาวได้หลายชนิดได้แก่ VP24, VP26, VP28, VP31, VP39 จากการทดสอบด้วยเทคนิค Far-Western blot ซึ่งจะเห็นได้ว่าโปรตีน

VP26 และ VP28 เป็นหนึ่งในโปรตีนห่อหุ้มของไวรัสตัวแดงดวงขาวสามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ SG ได้ (16) แต่อย่างไรก็ตามการทดสอบด้วยเทคนิค Far-Western blot เป็นการทดสอบภายใต้สภาวะที่โปรตีนอาจเกิดการเสียสภาพได้ ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าโปรตีน VP37 ที่เป็นหนึ่งในโปรตีนห่อหุ้มของไวรัสตัวแดงดวงขาวไม่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ SG ได้เนื่องจากโปรตีนเกิดการเสียสภาพทำให้ไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค Far-Western blot ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการตรวจสอบความสามารถในการจับขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งด้วย SG โดยใช้เทคนิคที่ไม่สนับสนุนให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพ ซึ่งจากการทดลองพบว่า SG มีความสามารถในการจับขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 ทั้งรูปแบบ Full length และ C-terminal domain กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่ง โดยความสามารถในการจับขวางปฏิสัมพันธ์จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ SG ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Kanokpan และคณะที่รายงานว่า SG มีความสามารถในการจับขวางการบุกรุกเข้าสู่เซลล์กึ่งของไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยความสามารถในการจับขวางจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ SG ที่เพิ่มขึ้น (15) ดังนั้นผลการทดลองนี้บ่งชี้ได้ว่าการออกฤทธิ์ของ SG อาจเกิดจากการที่ SG เข้าไปเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน VP37 ส่งผลให้ไวรัสตัวแดงดวงขาวไม่มีความสามารถในการเกิดปฏิสัมพันธ์กับเซลล์กึ่ง นอกจากนี้ยังพบว่าความสามารถในการจับขวางปฏิสัมพันธ์ของ SG ต่อโปรตีน VP37 รูปแบบ C-terminal domain มีแนวโน้มความสามารถในการจับขวางเช่นเดียวกับที่โปรตีน VP37 รูปแบบ Full length ซึ่งจากผลการทดลองนี้สนับสนุนการรายงานของนางสาวอัญชลี สาลีอาจ ว่าส่วน C-terminal domain ของโปรตีน VP37 เป็นส่วนสำคัญที่ใช้ในการยึดเกาะกับเซลล์กึ่ง (52) และยังสนับสนุนสมมุติฐานที่ว่าไวรัสอาจใช้โปรตีน VP37 ในการยึดเกาะกับเซลล์กึ่ง ดังนั้นจากการทดลองนี้บ่งชี้ได้ว่าสารสกัด SG จากสาหร่ายสีแดง (*Gracilaria fisheri*) มีความสามารถในการจับขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 ทั้งรูปแบบ Full length และ C-terminal domain กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่ง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า SG จะเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน VP37 จากการทดลองบ่งชี้ได้ว่าไวรัสตัวแดงดวงขาวอาจใช้โปรตีน VP37 ในการยึดเกาะกับเซลล์กึ่งเพื่อก่อให้เกิดกระบวนการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ จากสมมุติฐานดังกล่าวผู้วิจัยจึงทำการยืนยันปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ SG ด้วยเทคนิค Native-PAGE พบว่าโปรตีน VP37 ทั้งในรูปแบบ Full length และ C-terminal domain สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์ได้โดยตรงกับ SG ซึ่งสามารถเห็นได้จากการเกิดแถบโปรตีนที่มีขนาดสูงขึ้นเมื่อทำการเปรียบเทียบกับโปรตีน VP37 ที่ไม่ได้บ่มกับ SG จากการทดลองนี้บ่งชี้ได้ว่าโปรตีน VP37 สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ SG ได้ และสนับสนุนสมมุติฐานที่ว่า การออกฤทธิ์ของ SG อาจจะมีเป้าหมายที่โปรตีน VP37 ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการศึกษาเพิ่มเติมพบว่าสารสกัดจากสาหร่ายหลายชนิดมีคุณสมบัติในการต่อต้านไวรัส ยกตัวอย่างเช่น สารสกัด Fucoïdians จากสาหร่ายสีน้ำตาลในกลุ่ม *Sargassum* sp. พบว่ามีความสามารถในการต่อต้านเชื้อไวรัส เช่น สารสกัด Fucoïdians จากสาหร่ายสีน้ำตาล *Undari pinnatifada* มีความสามารถในการต่อต้าน herpes simplex virus (60) หรือ *Sargassum polycystum* มีความสามารถในการต่อต้านไวรัสตัว

แดงดวงขาว (61) และสารสกัด Sulfated galactans จากสาหร่ายสีแดง *Gracilaria tenuistipitata* มีความสามารถในการต่อต้านไวรัสในกุ้ง (62) ซึ่งสารสกัดเหล่านี้จัดเป็นสารในกลุ่ม Sulfate polysaccharide (SP) ซึ่งมีหมู่ซัลเฟตเป็นองค์ประกอบสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการต่อต้านการบุกรุกของไวรัส และแบคทีเรีย

5.3 โปรตีน VP37 สามารถจดจำสารในกลุ่ม Heparin

จากการทดลองก่อนหน้านี้ซึ่งได้ว่าสารสกัด SG จากสาหร่ายสีแดง (*Gracilaria fisheri*) เป็นสารในกลุ่ม SP มีความสามารถในการขัดขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง จึงเกิดสมมติฐานว่าบนผิวเซลล์กุ้งอาจมีโมเลกุลที่มีลักษณะคล้ายกับ SG (SG-like molecule) จึงทำให้โปรตีน VP37 สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ SG ได้และเมื่อทำการศึกษาเพิ่มเติมพบว่าในปี 2008 มีการรายงานการค้นพบ Heparin-like glycosaminoglycans ในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) (20) ต่อมาในปี 2011 มีการรายงานการค้นพบ Heparan sulfate ในกุ้งแช่บ๊วย (*Penaeus brasiliensis*) (21) ซึ่ง Heparan sulfate หรือ Heparin เป็นสารที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของ SPs ดังนั้นจึงเกิดสมมติฐานว่าโปรตีน VP37 อาจเกิดปฏิสัมพันธ์กับ Heparin-like glycosaminoglycans ใช่หรือไม่ ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงทำการทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 ในรูปแบบ Full length กับ Heparin ที่สกัดจากหมู เนื่องจากทางการค้าไม่มี Heparin ที่สกัดจากกุ้งและจากงานวิจัยของ Suely F. Chavante และคณะพบว่า Heparin ที่สกัดจากกุ้งมีความใกล้เคียงกับ Heparin ที่ทำการสกัดจากหมู (22) ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือก Heparin ที่สกัดจากหมูมาใช้ในการทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ Heparin ด้วยเทคนิค Native-PAGE จากการทดลองพบว่าโปรตีน VP37 มีแนวโน้มสามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ Heparin ได้ สังเกตได้จากความเข้มของแบนโปรตีนที่ค่อยๆลดลงตามความเข้มข้นของ Heparin ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าโปรตีน VP37 เกิดปฏิสัมพันธ์กับ Heparin แล้วทำให้เกิดเป็นสารประกอบ (VP37-heparin complex) ที่มีขนาดใหญ่และไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านร่างแห acrylamide ได้ จึงทำให้เห็นความเข้มของแบนโปรตีนค่อยๆลดลงตามความเข้มข้นของ Heparin ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสารประกอบ VP37-heparin complex ที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากการที่โปรตีน VP37 สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับหมู่ซัลเฟตของ Heparin โดยปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นนี้อาจจะอาศัย Heparin binding domain หรือการเกิด Charge-Charge interaction และเมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของ Heparin ส่งผลให้มีหมู่ซัลเฟตเพิ่มมากขึ้นทำให้ Heparin สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน VP37 ได้ดีขึ้นส่งผลให้ความเข้มของแบนโปรตีน VP37 ค่อยๆลดลงตามลำดับ จากการทดลองนี้สามารถบ่งชี้ได้ว่าโปรตีน VP37 มีความสามารถในการเกิดปฏิสัมพันธ์กับ Heparin ได้ และเมื่อทำการพิจารณาปฏิสัมพันธ์ของไวรัสชนิดอื่นกับ Heparin หรือสารในกลุ่ม SPs พบว่าไวรัสหลายชนิดใช้สารในกลุ่ม SPs เป็นหนึ่งในโมเลกุลตัวรับที่ช่วยให้ปฏิสัมพันธ์ระหว่างไวรัสกับเซลล์เจ้าบ้านมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น หรือไวสบางชนิดใช้สารในกลุ่ม SPs เป็นโมเลกุลตัวรับหลักที่ทำให้เกิดการยึดเกาะของไวรัสกับเซลล์เจ้าบ้าน ยกตัวอย่างเช่น การราย

ถึงบทบาทหน้าที่ของ Heparin ต่อการเป็นโมเลกุลตัวรับของไวรัส Rift Valley Fever Virus, Human Parainfluenza, Yellow Fever Virus และ Dengue Virus เป็นต้น (17 - 19) ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงทำการยืนยันปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ Heparin อีกครั้งด้วยเทคนิค Surface Plasmon Resonance (SPR) โดยจะทำการตรึง Heparin บนผิวหน้า SA chip และทำการฉีดโปรตีน VP37 รูปแบบ Full length ที่ความเข้มข้นต่างๆ จากการทดลองพบว่าโปรตีน VP37 สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ Heparin ได้ โดยความสามารถในการจับจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของโปรตีน VP37 ที่เพิ่มขึ้น และเมื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากการทดลองกับผลการทดลองที่ควรจะเป็นทางคณิตศาสตร์ (Fitting) พบว่าค่าความสามารถในการจับ (binding affinity, K_D) มีค่าเท่ากับ 1.0 μ M และเมื่อทำการพิจารณาความสามารถในการจับ (binding affinity, K_D) ดังนั้นจากข้อมูลที่กำลังมาข้างต้นบ่งชี้ได้ว่าโปรตีน VP37 ของไวรัสตัวแดงดวงขาวสามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ Heparin ได้ โดยอาจจะใช้ Heparin เป็น Co-receptor ที่ทำหน้าที่เหนี่ยวนำให้ไวรัสตัวแดงดวงขาวมีความใกล้ชิดกับเซลล์เจ้าบ้านเพิ่มมากขึ้น เพื่อเหนี่ยวนำให้โปรตีนอื่นของไวรัสตัวแดงดวงขาวเกิดปฏิสัมพันธ์กับโมเลกุลตัวรับของโปรตีนชนิดนั้น โดยปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน VP37 กับ Heparin อาจจะทำหน้าที่เป็นตัวเหนี่ยวนำ และสนับสนุนให้เกิดการยึดเกาะกันของไวรัสกับเซลล์

5.4 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ Heparin ถูกขัดขวางด้วย Sulfated galactans

จากการทดสอบก่อนหน้าพบว่าปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งสามารถถูกขัดขวางได้ด้วย SG และพบว่าโปรตีน VP37 สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์ได้โดยตรงกับ SG จึงอาจเป็นไปได้ว่าโปรตีน VP37 จะอาศัยโมเลกุลที่มีลักษณะใกล้เคียงกับ SG (SG-like molecule) เป็นโมเลกุลตัวรับ ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าบนผิวเซลล์กึ่งอาจมี SG-like molecule และเมื่อทำการศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมพบว่าบนผิวเซลล์กึ่งมีการรายงานการค้นพบสารในกลุ่ม SPs ซึ่งได้แก่ Heparan sulfate และ Heparin-like glycosaminoglycans และเมื่อทำการทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ Heparin ด้วยเทคนิค SPR พบว่าโปรตีน VP37 สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ Heparin ได้ ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงเกิดสมมุติฐานว่าความสามารถในการขัดขวางปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งด้วย SG นั้นจะออกฤทธิ์ที่ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ Heparin ใช่หรือไม่ ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการตรวจสอบสมมุติฐานนี้ในระดับโมเลกุลโดยในการทดสอบจะอาศัยเทคนิค SPR โดยในการทดลองจะนำโปรตีน VP37 มาทำการบ่มกับ SG ที่ความเข้มข้นต่างๆก่อนนำไปทำการฉีดผ่าน SA chip ที่ทำการตรึง Heparin บนผิวหน้า จากการทดลองพบว่าเมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของ SG ส่งผลให้ความสามารถในการจับของโปรตีน VP37 กับ Heparin ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจบ่งชี้ได้ว่าการออกฤทธิ์ของ SG อาจจะออกฤทธิ์ขัดขวางที่ปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน VP37 กับ Heparin และเมื่อ

ทำการศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมพบว่าการขัดขวางการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างไวรัสชนิดอื่นกับสารในกลุ่ม SPs นั้นส่งผลต่อความสามารถในการยึดเกาะหรือนุกรุกเข้าสู่เซลล์ของไวรัส ยกตัวอย่างเช่นกำจัดสารในกลุ่ม SPs โดยการใช้น้ำซอสในการกำจัด หรือการใช้ Sodium Chlorate ในการรบกวนการเกิด Charge-Charge interaction ส่งผลให้ความสามารถในการนุกรุกเข้าสู่เซลล์ของไวรัสลดลง ดังนั้นจากการทดลองนี้บ่งชี้ได้ว่าโปรตีน VP37 อาจจะใช้ Heparin เป็นโมเลกุลที่ตัวรับที่ช่วยสนับสนุนให้ไวรัสตัวแดงดวงขาวนุกรุกเข้าสู่เซลล์กึ่ง โดยอาจจะเป็นไปได้ว่าโปรตีน VP37 เกิดปฏิสัมพันธ์กับ Heparin เพื่อเหนี่ยวนำให้ไวรัสตัวแดงดวงขาวใกล้ชิดกับเซลล์กึ่งเพิ่มมากขึ้นเพื่อให้โปรตีนอื่นของไวรัสเกิดการปฏิสัมพันธ์กับโมเลกุลตัวรับของโปรตีนชนิดอื่นได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากการค้นพบนี้อาจนำไปสู่การพัฒนาวิธีการป้องกันการนุกรุกเข้าสู่เซลล์ของไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยอาจจะทำการออกแบบโมเลกุลขนาดเล็ก (small molecules) ที่มีลักษณะคล้ายกับ SPs เพื่อนำมาใช้ในการขัดขวางการนุกรุกเข้าสู่เซลล์ของไวรัสตัวแดงดวงขาว แต่อย่างไรก็ตามการทดสอบนี้เป็นเพียงจุดเริ่มต้นที่บ่งชี้ความเป็นไปได้ว่าโปรตีน VP37 อาจจะใช้ Heparin เป็นโมเลกุลตัวรับ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถสรุปได้อย่างแน่ชัดเนื่องจากงานวิจัยนี้ยังต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมเนื่องจาก Heparin ที่ใช้ในการทดสอบเป็นของหนู ดังนั้นยังคงเป็นสิ่งที่ต้องการทดสอบต่อไปในอนาคตที่จะทำการทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ Heparin ที่สกัดจากกึ่ง รวมถึงอาจจะทำการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Heparin หรือการใช้น้ำซอสที่จำเพาะต่อ Heparin มาทำการกำจัด Heparin บนผิวเซลล์กึ่งเพื่อเป็นการยืนยันปฏิสัมพันธ์นี้อีกครั้งหนึ่ง หรือการศึกษาปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน VP37 กับ Heparin อาจศึกษาปฏิสัมพันธ์ที่เกิดจาก Heparin binding motif หรืออาจเกิดจาก Charge-Charge interaction ซึ่งอาจจะทำการศึกษาโดยการหา Heparin binding motif ในลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน VP37 หรือการขัดขวางการเกิด Charge-Charge interaction แต่อย่างไรก็ตามจากการทดสอบในงานวิจัยนี้สามารถบ่งชี้ได้ว่าโปรตีน VP37 สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ Heparin ได้ และปฏิสัมพันธ์นี้สามารถถูกขัดขวางได้ด้วย SG

5.5 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ Heparin กับบทบาทหน้าที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่ง

กระบวนการนุกรุกเข้าสู่เซลล์ของไวรัสตัวแดงดวงขาวจะอาศัยการทำงานของโปรตีนห่อหุ้ม ในการยึดเกาะกับโมเลกุลตัวรับบนผิวเซลล์กึ่งก่อนนุกรุกเข้าสู่เซลล์ด้วยกระบวนการเอนโดไซโทซิส (endocytosis) ซึ่งในปัจจุบันพบว่าไวรัสตัวแดงดวงขาวมีโปรตีนห่อหุ้มหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่นโปรตีน VP28 ที่มีการรายงานว่าใช้ PmRab7, Hsc70 และ FcLec3 เป็นโมเลกุลตัวรับในการนุกรุกเข้าสู่เซลล์กึ่ง (10 - 12) แต่อย่างไรก็ตามพบว่า PmRab7 เป็นโมเลกุลตัวรับที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยน early endosome เป็น late endosome ซึ่งกระบวนการดังกล่าวจะเกิดขึ้นเมื่อไวรัสทำการนุกรุก

เข้าสู่เซลล์กึ่งแล้ว ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าไวรัสตัวแดงดวงขาวอาจจะใช้ปฏิสัมพันธ์อื่นร่วมด้วย ในการทำให้เกิดกระบวนการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของไวรัสตัวแดงดวงขาว ต่อมาในปี 2002 Canhua Huang และคณะค้นพบโปรตีนห่อหุ้มชนิดใหม่ที่มีขนาด 37 kDa โดยเรียกโปรตีนห่อหุ้มนี้ว่าโปรตีน VP37 (45) ต่อมาการศึกษาและรายงานพบว่าโปรตีน VP37 สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับเซลล์กึ่งได้ และโปรตีน VP37 อาจใช้ F1ATP synthase beta subunit หรือ Peritrophin-Like protein เป็น โมเลกุลตัวรับ (13 - 14) แต่จากการศึกษาก่อนหน้ายังไม่สามารถยืนยันได้ว่าโปรตีน VP37 ใช้ F1ATP synthase beta subunit เป็นโมเลกุลตัวรับเนื่องจากการทดสอบปฏิสัมพันธ์นี้เป็นการทำภายใต้สภาวะที่โปรตีนเกิดการเสียสภาพ (13) และ Peritrophin-Like protein เป็นการทดสอบโดยอาศัยเทคนิค yeast 2 hybriide ซึ่งเทคนิคนี้ไม่ทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนแต่ยังคงขาดหลักฐานที่ทำการยืนยันคุณภาพโปรตีนก่อนนำไปทดสอบ (14) ดังนั้นจึงยังไม่สามารถสรุปได้อย่างแน่ชัดว่าโปรตีน VP37 ใช้โมเลกุลใดเป็นโมเลกุลตัวรับ และในปี 2005 Wenlin Wu และคณะได้ทำการทดสอบความสำคัญของโปรตีนห่อหุ้มของไวรัสตัวแดงดวงขาวต่อการบุกรุกเข้าสู่เซลล์กึ่ง โดยทำการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนห่อหุ้มต่างๆของไวรัสตัวแดงดวงขาวแล้วนำไปปฏิกิริยากับไวรัสตัวแดงดวงขาวก่อนฉีดเข้ากึ่งและดูอัตราการตายที่เกิดขึ้น พบว่าไม่มีโปรตีนห่อหุ้มใดที่มีความสามารถในการขัดขวางการบุกรุกเข้าสู่เซลล์กึ่งได้ 100% (49) ดังนั้นการทดลองนี้จึงทำให้เกิดสมมุติฐานว่าไวรัสตัวแดงดวงขาวอาจใช้โปรตีนห่อหุ้มมากกว่า 1 ชนิดในการบุกรุกเข้าสู่เซลล์กึ่ง และเมื่อทำการพิจารณาถึงไวรัสชนิดอื่นพบว่า มีการรายงานของไวรัสหลายชนิดที่ใช้โมเลกุลตัวรับมากกว่า 1 ชนิด ยกตัวอย่างเช่น Classical Swine Fever Virus (84) และนอกจากนี้ในปี 2009 Qing-Hui Liu และคณะพบว่าโปรตีนห่อหุ้ม VP37 สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนห่อหุ้ม VP26 และ VP28 ได้ (53) และต่อมาในปี 2010 Yun-Shiang Chang และคณะรายงานพบว่าโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาวสามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กันได้โดยจะเรียกการเกิดปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนต่างๆนี้ว่า infectome (54) แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันก็ยังไม่ทราบอย่างแน่ชัดถึงบทบาทและหน้าที่ของการเกิด infectome แต่อาจเป็นไปได้ว่าการเกิดปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนต่างๆของไวรัสเกิดขึ้นเพื่อช่วยในการเกิดกระบวนการต่างๆของไวรัส โดย infectome สามารถแบ่งได้ออกเป็น 2 กลุ่มตามความสามารถในการจับกับ Chitin ได้แก่กลุ่มที่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ Chitin ได้และกลุ่มโปรตีนที่ไม่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ Chitin โดยโปรตีนทั้ง 2 กลุ่มนี้จะเชื่อมกันด้วยโปรตีน VP24 ที่ทำหน้าที่เป็นแกนกลางของการเกิด infectome (55) จากงานวิจัยนี้พบว่าโปรตีน VP37 สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์ได้กับ Heparin โดยมีค่าความสามารถในการจับ (binding affinity, Kd) อยู่ที่ 1.0 μ M และยังสามารถพบ Heparin-like glycosaminoglycans ได้ในกึ่ง ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าโปรตีน VP37 จะทำหน้าที่ในการเหนี่ยวนำให้ไวรัสตัวแดงดวงขาวเคลื่อนที่เข้าไปใกล้เซลล์กึ่งเพิ่มมากขึ้น เพื่อสนับสนุนให้ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนอื่นของไวรัสกับโมเลกุลตัวรับจำเพาะตัวที่ 2 เกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพ ยกตัวอย่างเช่นกลไกการบุกรุกของ Classical swine fever virus โดยกลไกในการบุกรุกของไวรัสชนิดนี้ขั้นแรกจะทำการจับกับ Heparin ก่อนเพื่อเหนี่ยวนำให้ไวรัสสามารถเข้าไปใกล้กับเซลล์

เข้าบ้านได้เพิ่มขึ้น จากนั้นจะเกิดปฏิสัมพันธ์กับโมเลกุลตัวรับ CD46 เพื่อให้ไวรัสบุกรุกเข้าสู่เซลล์ได้ จากรายงานวิจัยนี้ผู้วิจัยบ่งชี้ว่า Classical swine fever virus ใช้ Heparin เป็น Co-receptor ที่ทำหน้าที่เหนี่ยวนำหรือสนับสนุนให้ไวรัสบุกรุกเข้าสู่เซลล์ได้ (85) ซึ่งในกรณีของไวรัสตัวแดงดวงขาวอาจเป็นได้ว่าจะเป็นไวรัสตัวแดงดวงขาวอาศัยปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ Heparin เพื่อเหนี่ยวนำให้ไวรัสอยู่ใกล้กับเซลล์กึ่งเพื่อสนับสนุนให้เกิดปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน VP24 กับ chitin เพื่อเกิดกระบวนการเอนโดไซโทซิสเข้าสู่เซลล์ จากนั้นโปรตีน VP28 จะทำงานโดยการจับกับ PmRab7 เพื่อเปลี่ยนแปลงกระบวนการจาก early endosome ไปสู่ late endosome เมื่อไวรัสตัวแดงดวงขาวเข้าสู่ late endosome แล้วก็อาจจะเกิดการ ทำงานของโปรตีน VP26 ซึ่งทำหน้าที่เป็น matrix-like linker protein ระหว่างโปรตีนห่อหุ้มและนิวคลีโอแคพซิดส่งผลให้ไวรัสตัวแดงดวงขาวสามารถปลดปล่อยสารพันธุกรรมเข้าสู่นิวเคลียสของกึ่งเพื่อทำการเพิ่มจำนวนต่อไปได้ ดังนั้นจากความเป็นไปได้นี้อาจบ่งชี้ได้ว่าปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ Heparin เป็นปฏิสัมพันธ์ที่สำคัญเนื่องจากเป็นปฏิสัมพันธ์แรกที่ทำให้ไวรัสสามารถยึดเกาะกับหรือเคลื่อนที่เข้าใกล้เซลล์กึ่งได้ ดังนั้นหากเราทราบว่าโมเลกุลตัวรับที่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน VP37 นั้นมีลักษณะแบบใดก็สามารถที่จะพัฒนาหรือออกแบบยา หรือโมเลกุลขนาดเล็กที่มีลักษณะใกล้เคียงมาใช้เป็นตัวขัดขวางปฏิสัมพันธ์นั้นได้ ซึ่งอาจจะส่งผลให้ความสามารถในการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ลดลง

ดังนั้นจากการวิจัยนี้สามารถที่จะสรุปได้ว่าโปรตีน VP37 ซึ่งเป็นหนึ่งในโปรตีนห่อหุ้มของไวรัสที่มีความสามารถในการเกิดปฏิสัมพันธ์กับเซลล์กึ่งได้นั้นสามารถถูกขัดขวางได้ด้วย SG ซึ่งเป็นสารสกัดจากสาหร่ายสีแดง (*Gracilaria fisheri*) โดยการออกฤทธิ์ของ SG อาจจะออกฤทธิ์ที่ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VP37 กับ Heparin ดังนั้นงานวิจัยนี้อาจบ่งชี้ได้ว่าโมเลกุลบนผิวเซลล์กึ่งที่อาจจะทำหน้าที่เป็นโมเลกุลตัวรับให้กับโปรตีน VP37 คือ Heparin ที่เป็นสารในกลุ่ม SPs จากองค์ความรู้นี้อาจจะนำไปสู่แนวทางการคิดค้น และพัฒนาโมเลกุลที่มีลักษณะใกล้เคียงกับสารในกลุ่ม SPs เพื่อนำมาใช้ในการป้องกันและยับยั้งการระบาดของไวรัสตัวแดงดวงขาวต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- 1 ศูนย์วิจัยกสิกรไทย, 2560, **ช่องทางรอดส่งออกอาหารทะเลแปรรูปไทย** [online], Available: https://www.kasikornbank.com/th/business/sme/KSMEKnowledge/article/KSMEAnalysis/Pages/Export_Thai_Processed-Seafood_2017.aspx [5 พฤศจิกายน 2560].
- 2 กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ กองประมงต่างประเทศ กรมประมง ภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2555, **การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ** [online], Available: [http://www.fisheries.go.th/foreign/images/pdf/v07155\(13June12\).pdf](http://www.fisheries.go.th/foreign/images/pdf/v07155(13June12).pdf) [5 พฤศจิกายน 2560].
- 3 สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (สวก), **โรคของกุ้งกุลาดำ** [online], Available: <http://www.arda.or.th/kasetinfo/south/shrimp/controller/01-04.php> [5 พฤศจิกายน 2560].
- 4 หนังสือพิมพ์เดลินิวส์, 10 มิถุนายน 2560, **โรคตัวแดงดวงขาวระบาดระลอกใหม่ในออสเตรเลีย** [online], Available: <https://www.dailynews.co.th/agriculture/578652> [6 พฤศจิกายน 2560].
- 5 Chou, H.Y., Huang C.Y., Wang, C.H., Wang, C.H., Chiang, H.C. and Lo, C.F., 1995, "Pathogenicity of a Baculovirus Infection Causing White Spot Syndrome in Cultured Penaeid Shrimp in Taiwan", **Diseases of Aquatic Organisms**, Vol. 23, No., pp. 165-173.
- 6 Hulten, M.C.W., Witteveldet, J., Snippe, M. and Vlak, J.M., 2001, "White Spot Syndrome virus Envelope protein VP28 involved in the systemic infection of shrimp", **Virology**, Vol. 285, pp. 228-233.
- 7 Xie, X.X. and Yang, F., 2005, "Interaction of white spot syndrome virus VP26 protein with actin", **Virology**, Vol. 336, pp. 93-99.
- 8 Liang, Y., Huang, J., Song, X.L., Zhang, P.J. and Xu, H.S., 2005, "Four viral proteins of white spot syndrome virus (WSSV) that attach to shrimp cell membranes" **Diseases of Aquatic Organisms**, Vol. 66, pp. 81-85.
- 9 Liu, Q.H., Zhang, X.L., Ma, C.Y., Liang, Y. and Huang, J., 2009, "VP37 of white spot syndrome virus interact with shrimp cells" **Letter in Applied Microbiology**, Vol. 48, pp. 44-50.
- 10 Sritunyalucksana, K., Wannapapho, W., Lo, C.F. and Flegel, T.W., 2006, "PmRab7 is a VP28-binding protein involved in White spot syndrome virus infection in shrimp" **Journal of virology**, Vol. 80, pp. 10734-10742.

- 11 Xu, H., Yan, F., Deng, X., Wang, J., Zou, T., Ma, X., Zhang, X. and Qi, Y., 2009, "The Interaction of White Spot Syndrome Virus Envelope Protein Vp28 with Shrimp Hsc70 Is Specific and ATP-Dependent", **Fish & shellfish Immunology**, Vol. 26, pp. 414-421.
- 12 Wang, X.W., Xu, W.T., Zhang, X.W., Zhao, X.F., Yu, X.Q. and Wang, J.X., 2009, "A C-type Lectin is Involved in the Innate Immune Response of Chinese White Shrimp", **Fish & Shellfish Immunology**, Vol. 27, pp. 556-562.
- 13 Zhan, W., Wang, X., Chi Y., Tang, X., 2013, "The VP37-binding protein F₁ATP synthase β subunit involved in WSSV infection in shrimp *Litopenaeus vannamei*", **Fish & Shellfish immunology**, Vol. 34, pp. 228-235.
- 14 Xie, S., Zhang, X., Zhang, J., Li F. and Xiang, J., 2015, "Envelope protein of white spot syndrome virus (WSSV) interact with *Litopenaeus vannamei* Peritrophin-Like protein (LvPT)", **PLoS one**, 10(12), e0144922. Doi:10.1371/journal.pone.0144922.
- 15 Wongprasert, K., Rudtanatip T. and Praiboon, J., 2014, "Immunostimulatory activity of sulfated galactan isolated from the red seaweed *Gracilaria fisheri* and development of resistance against white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp", **Fish & Shellfish immunology**, Vol. 36, pp. 52-60.
- 16 Rudtanatip, T., Asuvapongpatana, S., Withyachumnarnkul, B. and Wongprasert, K., 2014, "Sulfated Galactan Isolated from the Red Seaweed *Gracilaria fisheri* Target the Envelope Proteins of White Spot Syndrome Virus and Protect Against Viral Infection in Shrimp Haemocytes", **Journal of General Virology**, Vol. 95, pp. 1126-1134.
- 17 Bose, S. and Banerjee, A.K., 2002, "Role of heparan sulfate in Human Parainfluenza Virus type 3 infection", **Virology**, Vol. 298, pp. 73-83.
- 18 Germi, R., Crance, J.M., Garin, D., Guimet, J., Jacob, H.L., Ruigrok, Rob, W.H., Zarski, J.P. and Drouet, E., 2002, "Heparan sulfate-mediated binding of infectious Dengue virus type 2 and Yellow Fever Virus", **Virology**, Vol. 292, pp. 162-168.
- 19 Boer, de, S.M., Kortekaas, J., Haan, de, C. A. M.P., Rottier, J. M., Moormann, R. J. M. and Bosch, B. J., 2012, "Heparan sulfate Facilitates Rift Valley Fever Virus entry into the cell", **Journal of Virology**, Vol. 86, pp. 13767-13771.
- 20 Brito, A.S., Arimatéia, D.S., Souza, L. R., Lima, M.A., Santos, V.O., Medeiros V.P., Ferreira, P.A., Silva, R.A., Ferreira, C.V., Justo, G.Z., Leite, E.L., Andrade, Giulianna, P.V., Oliveira,

- F.W., Nader, H.B. and Chavante, S.F., 2008, "Anti-inflammatory Properties of a Heparin-like Glycosaminoglycan with Reduced Anti-coagulant Activity Isolated from a Marine Shrimp", **Bioorganic & medicinal chemistry**, Vol. 16, pp. 9588-9595.
- 21 Chen, J., Yamada, S., Hama, Y., Shetty, A.K., Kobayashi, T., Oda, H., Seiki, K., Kim, E., Kimura, T., Takahashi, N., Hidari, I.P.J, Kazuya., Suzuki T. and Sugahara, K., 2011, "Unique Heparan Sulfate from Shrimp Head Exhibits a Strong Inhibitory Effect on Infections by Dengue Virus and Japanese Encephalitis Virus", **Biochemical and Biophysiology Research Communications**, Vol. 412, pp. 136-142.
 - 22 Chavante S.F., Brito, A.S., Lima, M., Yates, E., Nader, H., Guerrini, M., Torri, G. and Bisio, A., 2014, "A heparin-like Glycosaminoglycan from Shrimp Containing High Levels of 3-O-sulfated S-glucosamine Groups in an Unusual Trisaccharide Sequence", **Carbohydrate Research**, Vol. 390, pp. 59-66.
 - 23 ระบบศูนย์ปฏิบัติการกรมประมง, 2559, การค้าสินค้าประมงปี 2559 [online], Available: <http://edoc.fisheries.go.th/> [6 พฤศจิกายน 2560].
 - 24 สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2558, สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้มปี 2558 [online],
Available: <http://www.foodfti.com/Files/Name/CONTENT474087522960.pdf>
[6 พฤศจิกายน 2560]
 - 25 ศูนย์วิจัยระยะเพื่ออุตสาหกรรมอาหาร, พฤศจิกายน 2558, อุตสาหกรรมกุ้งไทย [online] Available: <http://fic.nfi.or.th/foodsectordatabank-detail.php?id=7> [6 พฤศจิกายน 2560].
 - 26 สมาคมอาหารแช่เยือกแข็งไทย, 2543, ปัญหาโรคกุ้งตายด่วน [online] Available: http://www.thai-frozen.or.th/newsletters_jan2014_03.php [6 พฤศจิกายน 2560].
 - 27 ชะลอ ลีมสุวรรณ, 2546, โรคกุ้งขาวแวนนาไม [online]
Available: <http://www.shrimpcenter.com/t-shrimp043.html> [6 พฤศจิกายน 2560].
 - 28 หนังสือพิมพ์ประชาชาติ, 22 กันยายน 2560, โรคระบาด IMNV ล้อมไทยประมงห้ามนำเข้ากุ้ง 5 ชนิด [online] Available: <https://www.prachachat.net/economy/news-43336>
[6 พฤศจิกายน 2560].

- 29 หนังสือพิมพ์ฐานเศรษฐกิจ, 6 มกราคม 2560, **ออสซีเต็มพบโรคตัวแดงดวงขาวระบาดในฟาร์มกุ้งเตรียมระงับการนำเข้ากุ้งสด** [online],
Available: <http://www.thansettakij.com/content/123675> [6 พฤศจิกายน 2560].
- 30 Inouye, K., Miwa, S., Oseka, N., Nakano, H., Kimura, T., Momoyama, K. and Hiraoka, M., 1994, “Mass Mortalities of cultured Kuruma Shrimp *Penaeus japonicus* in japan in 1993: Electron Microscopic Evidence of the Causative virus”, **Fish Pathology**, Vol. 29, pp. 149-158.
- 31 Takahashi, Y., Itami, T., Maeda, M., Suzuki, N., kasornchandra, J., Supamattaya, K., Khongpradit, R., Boonyaratpalin, S., Kondo, M., Kawai, K., Kusuda, R., Hirono, I. and Aoki, T., 1996, “Polymerase chain reaction (PCR) amplification of bacilliform virus (RV-PJ) DNA in *Penaeus japonicus* bete and systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV) DNA in *Penaeus monodon*”, **Journal of Fish Diseases**, Vol. 19, pp. 399-403.
- 32 สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง (สสช.), **โรคสัตว์น้ำ: โรคตัวแดงดวงขาว (White spot disease, WSD)** [online]
Available: <http://www.aquathai.org/jvmyhn19-4.html?&Page=ArticlePlay&Article=216>
[6 พฤศจิกายน 2560].
- 33 Marielle C. W. van Hulten, Jaroen Witteveldt, Sander Peters, Nico Kollsterboer, Renato Tarchini, Mark Fiers, Hans Sandbrink, Rene Klein Lankhorst and Just M. Vlak, 2001, “The White Spot Syndrome Virus DNA Genome Sequence”, **Virology**, Vol. 286, pp. 7-22.
- 34 Mayao, M.A., 2002, “Virus Taxonomy – Houston 2002”, **Arch Virol**, Vol. 147, No. 5, pp. 1071-1076.
- 35 Yang, F., He, J., Lin, X., Li, Q., Pan, D., Zhang, X. and Xu, X., 2001, “Complete Genome Sequence of Shrimp White Spot Bacilliform Virus”, **Journal of Virology**, Vol. 75, No. 23, pp. 11811 - 11820.
- 36 Li, Z., Lin Q., Chen, J., Wu, J. L., Lim, T.W., Loh, S.S., Tang, X. and Hew, C.R., 2007, “Shortgun Identification of the Structural Proteome of Shrimp White Spot Syndrome Virus and iTRAQ Differentiation of Envelope and Nucleocapsid Subproteomes”, **Molecular & Cellular Proteomics**, Vol. 6, No. 9, pp. 1609-1620.

- 37 Wu, J.L. and Muroga, K., 2004, "Apoptosis does not Play an Important Role in the Resistance of Immune *Penaeus japonicus* against White Spot Syndrome Virus", **Journal of Fish Diseases**, Vol. 27, No. 1, pp. 15 - 21.
- 38 Wang, Z., Hu, L., Yi, G., Xu, H., Qi, Y. and Yao, L., 2004, "Orf390 of White Spot Syndrome Virus Genome Is Identified as a Novel Anti-Apoptosis Gene", **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Vol. 325, No. 3, pp. 899 - 907.
- 39 He, F., Fenner, B.J., Godwin, A.K. and Kwang, J., 2006, "White spot syndrome virus open reading frame 222 encodes a viral E3 ligase and mediates degradation of a host tumor suppressor via ubiquitination", **Journal of Virology**, Vol. 80, No. 8, pp. 3884 - 3892.
- 40 Lin, S.T., Chang, Y.S., Wang, H.C., Tzeng, H.F., Chang, Z.F., Lin, J.Y., Wang, C.H., Lo, C.F. and Kou, G.H., 2002, "Ribonucleotide Reductase of Shrimp White Spot Syndrome Virus (WSSV): Expression and Enzymatic Activity in a Baculovirus/insect Cell System and WSSV-Infected Shrimp", **Virology**, Vol. 304, No. 2, pp. 282 - 290.
- 41 Escobedo-Bonilla, C.M., Alday-Sanz, V., Wille, M., Sorgeloos, P., Pensaert, M. B. and Nauwynck, H. J., 2008, "A Review on the Morphology, Molecular Characterization, Morphogenesis and Pathogenesis of White Spot Syndrome Virus", **Journal of Fish Disease**, Vol. 31, pp. 1-18.
- 42 Hulten, M.C.W., Westenberg, M., Goodall, S.D. and Vlak, J.M., 2000, "Identification of Two Major Virion Protein Genes of White Spot Syndrome Virus of Shrimp", **Virology**, Vol. 266, pp. 227-236.
- 43 Zhang, X., Huang, C., Xu, X. and Hew, C.L., 2002, "Identification and Localization of a Prawn White Spot Syndrome Virus Gene that Encodes an Envelope Protein", **Journal of General Virology**, Vol. 83, pp. 1069-1074.
- 44 Yi, G., Qi, Yipeng, Z.W., Yao, L., Qian J. and Hu, L., 2004, "Vp28 of Shrimp White Spot Syndrome Virus Is Involved in the Attachment and Penetration into Shrimp Cell", **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, Vol. 37, No. 6, pp. 726-734.
- 45 Huang, C., Zhang, X., Lin, Q., Xu, X. and Hew, C.L., 2002, "Characterization of a Novel Envelope Protein (VP281) of Shrimp White Spot Syndrome Virus by Mass Spectrometry", **Journal of general virology**, Vol. 83, pp. 2385-2392.

- 46 Huang, C., Zhang, X., Lin, Q. Xun, X., Hu, Z. and Hew, C.L., 2002, “Proteomic Analysis of Shrimp White Spot Syndrome Viral Proteins and Characterization of a Novel Envelope Protein VP466”, **Molecular & Cellular Proteomics**, Vol. 1, pp. 223-231.
- 47 Ruoslahti, E. and Pierschbacher, M.D., 1986, “Arg–Gly–Asp: a Versatile Cell Recognition Signal, **Cell**, Vol. 44, No. 4, pp. 517 - 518.
- 48 Liang, Y., Song, Xiao-Ling, J.H., Zhang, P.J. and Xu, X.S., 2005, "Four Viral Proteins of White Spot Syndrome Virus (Wssv) That Attach to Shrimp Cell Membrane", **Diseases of Aquatic Organisms**, Vol. 66, pp. 81-85.
- 49 Wu, W., Wang L. and Zhang, X., 2005, “Identification of White Spot Syndrome Virus (WSSV) Envelope Proteins Involved in Shrimp Infection”, **Virology**, Vol. 332, pp. 578-583.
- 50 Liu Q.H., Huang J., Han W.J., Yan, L., Lu C.L. and Wang Q.Y., 2006, “Expression, Purification and Characterization of WSSV-VP37 in *Pichia pastoris*” **Aquaculture**, Vol. 258, pp. 55-62.
- 51 Li, C., Gao, X.X., Huang, L. and Liang, Y., 2015, “Studies of the Viral Binding Proteins of Shrimp BP53, a Receptor of White Spot Syndrome Virus. **Journal of Invertebrate Pathology**”, Vol. 134, pp. 48-53.
- 52 Liu, Q.H., Ma, C.Y., Chen, W.B., Zhang, X.L., Liang Y., Dong, S.L. and Huang, J., 2009, “White Spot Syndrome Virus VP37 Interact with VP28 and VP26”, **Diseases of Aquatic Organisms**, Vol. 85, pp. 23-30.
- 53 Chang, Y.S., Liu, W.J., Lee, C.C., Chou, T.L., Lee, Y.T., Wu, T.S., Huang, J.Y., Huang, J.Y., Lee, T.L., Kou, G.H., Wang, A.H.J. and Lo, C.F., 2010, “A 3D Model of the Membrane Protein Complex formed by the White Spot Syndrome Virus Structural Rroteins”, **PLoS One** 5(5): e10718. Doi:10.1371/journal.pone.0010718.
- 54 Huang, P.Y., Leu, J.H. and Chen, L.L., 2014, “A Newly Identified Protein Complex that Mediates White Spot Syndrome Virus Infection Via chitin-binding Protein” **Journal of General virology**, Vol. 95, pp. 1799-1808.
- 55 สุวรรณี ทองมาลี, 2014, การใช้วิธีทางเคมีในการลดขนาดและเติมหมู่ซัลเฟตในอัลจินตพอลิเมอร์เพื่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ, วิทยานิพนธ์ปริญญาโทฉบับนี้ สาขาวิชาจุลชีววิทยาบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร, หน้า 5-24.

- 56 Witvrouw, M. and Clercq, E.De., 1997, "Review: Sulfated Polysaccharide Extracted from Sea Algae as Potential Antiviral Drugs", **Gen Pharmac**, Vol. 29, pp. 497-511.
- 57 Huynh, T.G, Yeh, S.T., Lin, Y.C., Shyu, J.F., Chen, L.L. and Chen, J.C., 2011, "White shrimp *Litopenaeus vannamei* Immersed in Seawater Containing *Sargassum hemiphyllum* var. *Chinense* Powder and Its Extract Showed Increased Immunity and Resistance Against *Vibrio Alginolyticus* and White Spot Syndrome Virus" **Fish & Shellfish Immunology**, Vol. 31 pp. 286-293.
- 58 Immanuel, G., Sivagnanavelmurugan, M., Marudhupandi, T., Radhakrishnan, S. and Palavesam, A., 2012, "The Effect of Fucoidan from Brown Seaweed *Sargassum wightii* on WSSV Resistance and Immune Activity in Shrimp *Penaeus monodon* (Fab)", **Fish & Shellfish Immunology**, Vol. 32 No. 4 pp. 551-564.
- 59 Hayashi, K., Nakano, T., Hashimoto, M., Kanekiyo, K. and Hayashi, T., 2008, "Defensive Effects of a Fucoidan from Brown Alga *Undaria pinnatifida* Against Herpes Simplex Virus Infection", **International Immunopharmacology**, Vol. 8, pp. 109-116.
- 60 Chotigeat, W., Tongsupa, S., Supamataya, K. and Phongdara, A., 2004, "Effect of Fucoidan on Disease Resistance of Black Tiger Shrimp", **Aquaculture**, Vol. 233, pp. 23-30.
- 61 Sirirsutanun, N., Chen, J.C., Lin, Y.C., Yeh, S.T., Liou, C.H., Chen, L.L., Sim, S.S. and Chiew, S.L., 2011, "Dietary Administration of a *Gracilaria tenuistipitata* Extract Enhances the Immune Response and Resistance Against *Vibrio alginolyticus* and White Spot Syndrome Virus in the White Shrimp *Litopenaeus vannamei*", **Fish & Shellfish Immunology**, Vol. 31, pp. 848-855.
- 62 Mazumder, S., Ghosal, P.K., Pujol, C.A., Carlucci, M.J., Damonte, E.B. and Ray, B., 2002, "Isolation, Chemical Investigation and Antiviral Activity of Polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae Rhodophyta)", **International Journal of Biological Macromolecules**, Vol. 31, pp. 87-95.
- 63 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2559, **Types and Component of Extracellular Matrix** [online], Available: <http://www.cai.md.chula.ac.th/lesson/histology/unit03/html/component.html> [8 พฤศจิกายน 2560].

- 64 Michael, W.K., 2017, **Glycosaminoglycans** [online],
Available: <http://themedicalbiochemistrypage.org/glycans.php> [8 พฤศจิกายน 2560].
- 65 K.K, J.D.E., and Lindahl, U., 2009, **Chapter 16 Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans** [online], Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1900/>
[8 พฤศจิกายน 2560].
- 66 Tingbo, M.G., Pedersen, M.E., Grondahl, F., Kolset, S.O., Veiseth-Kent, E., Enersen and G., Hannesson, K.O., 2012, "Type of Carbohydrate in Feed Affects the Expression of Small Leucine-Rich Proteoglycans (SLRPs), Glycosaminoglycans (GAGs) and Interleukins in Skeletal Muscle of Atlantic Cod (*Gadus Morhua* L.)", **Fish & Shellfish Immunology**, Vol. 33, pp. 582-589.
- 67 Marchetti, M.E.T., Superti, F., Johansson M. and Bergstrom, T., 2003, "Inhibition of Herpes Simplex Virus Infection by Lactoferrin Is Dependent on Interference with the Virus Binding to Glycosaminoglycans", **Virology**, Vol. 318, No. 1, pp. 405-413.
- 68 Adah, Heidi Barth, C.S.M., Zhang, F., Linhardt, R.J., Toyoda, H., Akiko K.T., Toshihik, T., Kuppevelt, T.H., Depla E., Weizsacker, F.V., Blum, H.E. and Baumert, T.F., 2003, "Cellular Binding of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 Require Cell Surface Heparan Sulfate", **The Journal of Biological Chemistry**, Vol. 278, No. 42, pp. 41003-41012.
- 69 Gibthai a 3N Holding company, 2559, การแยกโปรตีนโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส [online]
Available: http://www.gibthai.com/services/technical_detail.php?ID=20 Gel shift
[8 พฤศจิกายน 2560].
- 70 Bio-Rad Laboratories, 2015, **A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection** [online],
Available: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf
[8 พฤศจิกายน 2560].
- 71 ThermoFisher Scientific, **Gel Shift Assay** [online],
Available: <https://www.thermofisher.com/th/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/gel-shift-assays-emsa.html> [8 พฤศจิกายน 2560].

- 72 Noborn, F., Hermansson, P.O.C., Erik., Zhang, X., Ancsin, J.B., Damas, A.M., Dacklin, I., Presto, J., Johansson, J., Saraiva, M.J., Lundgren, E., Kisilevsky, R., Westermark, P. and Li, J.P., 2011, "Heparan Sulfate/Heparin Promotes Transthyretin Fibrillization through Selective Binding to a Basic Motif in the Protein", **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Vol. 108, No. 14, pp. 5584–5589.
- 73 **ThermoFisher scientific**, Overview of ELISA [online],
Available: <https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html> [10 พฤศจิกายน 2560].
- 74 โชคชัย พุทธรักษา, 2014, “การประยุกต์ใช้เทคนิคคลื่นผิวพลาสมอนเรโซแนนซ์ในไบโอเซนเซอร์”, **วารสารวิทยาศาสตร์ มศว.**, ปีที่ 30, เล่มที่ 2, หน้า 167-186.
- 75 Hahnefeld, C., Drewianka, S., and Herberg, F.W., “Determination of Kinetic Data Using Surface Plasmon Resonance Biosensors”, **Molecular Diagnosis of Infectious Diseases.**, Vol. 94, pp. 299-320.
- 76 อัญชลี ลำภา, 2547, “ไบโอเซนเซอร์: การสร้าง การทำงาน และประโยชน์ของไบโอเซนเซอร์ (Biosensor: fabrication, operation and its applications)”, **MTEC**, หน้า 1-6.
- 77 **GE Healthcare**, 2012, Basic theory of kinetics, [online]
Available: https://www.biacore.com/lifesciences/help/basic_theory_of_kinetics/index.html [10 มกราคม 2560].
- 78 Vinogradov, A.P., Dorofeenko, A.V., Pukhov, A.A. and Lisiansky, A.A., 2017, **Exciting of Surface Plasmon Polaritons in the Kretschmann Configuration.**,
- 79 UMassAmherst, GE Biacore T200 Surface Plasmon Resonance, [online],
Available: <https://www.umass.edu/ials/biophysical-characterization/ge-biacore-t200> [10 พฤศจิกายน 2560].
- 80 **GE Healthcare life science**, 2012, Biacore Assay Handbbok 29-0194-00 Edition AA, [online],
Available: <https://www.gelifesciences.co.jp/contact/pdf/BiacoreAssayHandbook.pdf> [10 พฤศจิกายน 2560].

- 81 **AG Scientific Blogger**, 2013, Iptg: Triggers the Transcription of the Lac Operon [online], Available: <http://agscientific.com/blog/2013/01/iptg-triggers-the-transcription-of-the-lac-operon/> [8 พฤศจิกายน 2560].
- 82 **European Molecular Biology Laboratory**, 2017, Choice of Lysis Buffer and Additives [online], Available: https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/protein_purification/extraction_clarification/lysis_buffer_additives/ [8 พฤศจิกายน 2560].
- 83 **Harvard Apparatus**, 2012, Guide to Gel Filtration or Size Exclusion Chromatography [online], Available: <https://www.harvardapparatus.com/media/harvard/pdf/Guide+for+Gel+Filtration.pdf> [8 พฤศจิกายน 2560].
- 84 Dräger, C., Beer, M. and Blome, S., 2015, “Porcine Complement Regulatory Protein CD46 and Heparan Sulfates are the Major Factors for Classical Swine Fever Virus Attachment *in vitro*”, **Arch Virol**, Vol. 160, pp. 739-746.
- 85 อภิสิทธิ์า ชูเทศะ, สมหมาย หอมสวาท และ จตุพร หนูสุค, **สไลด์สาธิตการทำ SDS-PAGE**, ภาควิชาสรีรวิทยา ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกสัตว์เลี้ยง คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.



Full length article

C-terminal domain of WSSV VP37 is responsible for shrimp haemocytes binding which can be inhibited by sulfated galactan



Nantharat Sotanon^a, Anchulee Saleeart^a, Triwit Rattanarojpong^a, Ha Thanh Dong^a,
Saengchan Senapin^{b,c}, Kanokpan Wongprasert^d, Sukuman Sarikavanij^e, Pongsak Khunrae^{a,*}

^a Department of Microbiology, Faculty of Science, King Mongkut's University of Technology Thonburi (KMUTT), Bangkok 10140, Thailand

^b National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, Pathumthani 12120, Thailand

^c Center of Excellence for Shrimp Molecular Biology and Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, 272 Rama VI Road, Bangkok, 10400, Thailand

^d Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Rd, Rajdhevi, Bangkok 10400, Thailand

^e Department of Mathematics, Faculty of Science, King Mongkut's University of Technology Thonburi (KMUTT), Bangkok 10140, Thailand

ARTICLE INFO

Keywords:

Heparin
Shrimp
Sulfated galactan
VP37
WSSV

ABSTRACT

Viral envelope proteins play an important role in facilitating the attachment of viruses to the surface of host cells. Here, we investigated the binding of White Spot Syndrome Virus (WSSV) VP37 to haemocytes of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Three versions of recombinant VP37 proteins, including full length VP37 (VP37₍₁₋₂₈₁₎), C-terminal domain VP37 (VP37₍₁₁₁₋₂₈₁₎) and C-terminal domain disrupted VP37 (VP37₍₁₋₂₅₀₎) were individually expressed and tested for their haemocytes binding ability. Through an ELISA-based binding assay, we found that VP37₍₁₁₁₋₂₈₁₎ bound to shrimp haemocytes in a similar way to VP37₍₁₋₂₈₁₎, while VP37₍₁₋₂₅₀₎ exhibited a significantly weaker binding. This suggests that the C-terminal domain of VP37 is required for the binding of VP37 to shrimp haemocytes. Furthermore, we found that the binding of VP37 to shrimp haemocytes was impaired by pre-incubation of VP37 with sulfated galactan (SG), a sulfated polysaccharide derived from red seaweed (*Gracilaria fisheri*). Previously, it has been shown that a type of sulfated polysaccharide, heparin, is also present in *L. vannamei*. To investigate the role of heparin as a receptor for VP37, the binding of VP37 to porcine heparin, whose structure is similar to that found in *L. vannamei*, was investigated in a Surface Plasmon Resonance (SPR) system. The results showed that VP37 bound strongly to heparin with binding affinity (K_D) of 1.0 μ M and the binding was significantly blocked by SG. These findings have lead us to propose that the attachment of WSSV might be mediated by the interaction between VP37 and a heparin-like molecule presented on the shrimp cells.

1. Introduction

White spot syndrome virus (WSSV) is a closed circular double-stranded DNA virus, which belongs to the genus *Whispovirus*, family *Nimaviridae* [1]. The virus is recognized as one of the major threats to the aquaculture shrimp industry [2]. Shrimp infected with WSSV can result in up to 100% cumulative mortality within 3–10 days. Until now, no effective therapeutic treatment for WSSV has been introduced to the shrimp aquaculture industry due to a limited understanding of disease pathogenesis.

Viral attachment to host cells is the most critical step for infection which relates to several envelope proteins of WSSV virions such as VP28, VP26 and VP37 (or VP281) [3–7]. The VP37 gene contains 843 nucleotides, encoding 281 amino acids with a molecular weight of 31 ± 5 kDa [6]. VP37 has been reported in several studies as an envelope protein that binds to shrimp cells [5–10]. Neutralization of

WSSV using an anti-VP37 antibody resulted in a decrease in the binding level of the virus to shrimp cells and reduced the mortality rate in experimentally infected shrimp [7]. Moreover, pre-incubation of shrimp haemocytes with VP37 reduced WSSV infection in the haemocytes [8]. All of this evidence supports the view that the attachment of WSSV on the shrimp cells might be facilitated by VP37. However, the mechanism underlying the interaction between VP37 and its receptor is still unclear. So far, through viral overlay protein binding assay and yeast two-hybrid assay, F1ATP synthase beta subunit [9] and peritrophin-like protein [11] have been reported, respectively, as a potential shrimp receptor responsible for binding to VP37. Whether these two molecules are really a receptor for VP37 is yet to be confirmed by a more direct protein binding assay.

Various natural bioactive compounds possess antiviral activities, especially the group of compounds which contain sulfated polysaccharides (SPs) [12]. Fucoidan isolated from a genus of brown

* Corresponding author.

E-mail address: pongsak.khu@kmutt.ac.th (P. Khunrae).

macroalgae, *Sargassum* sp., showed antiviral activities. For instance, crude fucoidan extracted from *Sargassum polycystum* inhibited WSSV infection in shrimp [13] while the extract from brown algae, *Undaria pinnatifida* inhibited herpes simplex virus infection [14]. Sulfated galactan (SG) is a compound derived from red seaweed. It is an anionic polysaccharide whose linear backbone consists of alternating 3-linked β -D-galactopyranose and 4 linked 3,6 anhydrogalactose units with partial 6-O-methylate- β -D-galactopyranose [15]. The extract from *Gracilaria tenuistipitata* showed antiviral activity against WSSV in shrimp [16]. Kanokpan et al. also reported that oral SG administration could reduce mortality in experimentally WSSV-infected shrimp and protect against viral infection in shrimp haemocytes [15,17]. Interestingly, the ability of SG to protect WSSV infection in shrimp haemocytes depends on the degree of sulfation in SG [17]. In the same study, several structural proteins of WSSV including VP24, VP26, VP28, VP31, and VP39 were seen to interact with SG [17]. Since the binding assay of SG to WSSV proteins reported in an earlier study carried out by Far-Western blot, it is possible that VP37 as well as other WSSV envelope proteins might have been denatured and that the denatured proteins cannot bind to SG.

Heparin is a highly sulfated glycosaminoglycans (GAGs), having a repeating disaccharide unit of N-acetylated or N-Sulfated hexosamine and uronic acid or galactose [18], and has been reported to act as a receptor for several viruses including Rift Valley Fever Virus [19], Human Parainfluenza Virus [20], Yellow Fever Virus and Dengue Virus [21]. The interaction between heparin and these viruses relies largely on the sulfate groups in heparin molecules. Interestingly, previous studies have found heparin also presented in shrimp [22–24]. The main objective of this study is to investigate the interaction between VP37 and shrimp haemocytes with an attempt to understand the role of heparin as a binding target for VP37. The data presented in this study may assist in providing a better understanding of the attachment of WSSV on the surface of shrimp cells.

2. Material and method

2.1. Construction of rVP37 plasmids

The secondary structure of VP37 was predicted using JPred server [25]. Structural predictions suggest that VP37 might contain two domains linked together through a flexible region (Fig. 1). Thus, in order to identify the domain of VP37 that is required for interaction with shrimp haemocytes, this study expressed different truncated versions of VP37 proteins for *in vitro* assays. Primers used in this study (Table 1) were designed based on the complete gene sequence of VP37 (accession no. AF411634) in the GenBank database. These primers targeted for VP37-full length, VP37_(1–281), (843 bp), VP37-C-terminal domain, VP37_(111–281), (513 bp) and VP37-C-terminal domain disrupted, VP37_(1–250), (750bp). PCR amplifications were performed using the designed primers and genomic DNA of WSSV was used as a template. Each PCR reaction contains 25 μ l of 100 ng of WSSV template, 0.2 μ M of each primer, 0.2 mM of dNTP mix, and 0.5 U of Taq DNA polymerase (Stratagene, CA, USA) in 1 $\times$ PCR reaction buffer. The PCR conditions were 94 °C for 5 min; 25 cycles of 95 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 10 min. PCR products were purified using DNA purification kit (Geneaid, New Taipei City, Taiwan). The purified PCR products were digested with *Bam*HI and *Xho*I prior to ligation into pET15b vector which had been modified to contain bacterial thioredoxin and TEV cleavage encoding sequence placed upstream of the multicloning site. Successful in-frame insertion in the recombinant vectors was confirmed by DNA sequencing analysis.

2.2. Expression and purification of rVP37

The pET15b-thioredoxin expression vectors contained either VP37_(1–281), VP37_(111–281) or VP37_(1–250) encoding sequence in-frame

with the thioredoxin and TEV cleavage were transformed into *E. coli* strain BL21. The cells were grown in 2xYT broth medium at 37 °C for 3–4 h with shaking at 200 rpm until OD₆₀₀ reached 0.5 and then IPTG was added to the final concentration of 1.0 mM and continued incubation at 20 °C overnight. The bacterial cells were harvested by brief centrifugation at 6200 $\times$ g for 10 min, resuspended in lysis buffer (20 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole, 0.5% Triton X-100) and lysed by sonication. The lysed cells were centrifuged at 14,500 $\times$ g for 20 min and purified by affinity chromatography using Ni-NTA (nickel-nitrilotriacetic acid) sepharose (Qiagen, Hilden, Germany). The supernatant was loaded into Ni-NTA affinity column, washed with lysis buffer and eluted with buffer (20 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 250 mM imidazole). After elution, the protein was buffer exchanged into phosphate buffer saline (PBS) by PD10 Desalting columns (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), having Sephadex G-25 as a media. The protein was further purified by using a gel filtration column Superdex 200 16/60 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), having PBS as a running buffer, and concentrated to a desirable concentration. VP37_(1–281) without thioredoxin was prepared by adding 1 mg of TEV protease per 5 mg of VP37_(1–281) and incubated at 4 °C for overnight. The TEV cleaved protein was passed through a Ni-NTA affinity column and concentrated using Amicon Ultra centrifugal filter device (10,000 Da molecular weight cutoff). The protein was further purified using a gel filtration column Superdex 200 16/60 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) and equilibrated into HBS buffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 50 μ M ethylenediaminetetraacetic acid, 0.05% Tween 20, pH 7.4).

2.3. SDS-PAGE and western blot

Three versions of purified VP37 proteins were individually analyzed by SDS-PAGE prior to transferring to the PVDF membrane. The membrane was then incubated with blocking buffer (5% skim milk in PBS) at 4 °C overnight. Following a washing with PBST (PBS + 0.05% Tween 20), the membrane was incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-His antibody (1: 4000 in PBS) for 1.30 h at room temperature. The membrane was then washed twice with PBST. The detection signal was developed by ECL substrate (Biorad, CA, USA) and photographed under ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden).

2.4. Binding assay of VP37 with shrimp haemocytes using ELISA

Whiteleg shrimps ($n = 20$; body weight 10 g) obtained from a commercial farm in Samut Songkhram province, Thailand, provided by Charoen Pokphand Foods PCL, were used for haemocytes collection in this study. After anesthesia using cold ice, haemolymph was collected from the heart of each shrimp using a syringe containing 500 μ l of an anticoagulant solution (450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM EDTA, 10 mM HEPES, pH 7.2). The collected haemolymph was centrifuged and haemocytes re-suspended into 2xL15 (Leibovitz 15, Invitrogen, CA, USA) medium. A 96-wells plate (Nunc MaxiSorp® flat-bottom, Invitrogen, CA, USA) was coated with shrimp haemocytes as follows: 100 μ l of haemocytes (equivalent 2×10^6 cells, counted by hemocytometer) was added to each well. After 2 h of incubation, the wells were washed twice with 2xL15 and blocked with 5% BSA in 2xL15 at 27 °C for 16 h. VP37_(1–281) were added at different concentrations (0.05, 0.2 and 0.5 mg/ml) with triplicates, incubated at 4 °C for 4 h and washed three times with 2xL15. Then, anti-His antibody (1:4000 in PBS) was added to all wells (100 μ l/well) and incubated for 2 h. The plate was washed again with 2xL15 (three times) and 100 μ l of HRP-conjugated anti-His antibody (1: 4000 in PBS) was added to each well and incubated for 2 h. Following washing three times with 2xL15, 100 μ l 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB, PanReac AppliChem, Darmstadt, Germany) substrate was added to all wells. The reaction was terminated after 5 min in the dark at room temperature by adding 100 μ l of



Fig. 1. Schematic diagram of secondary structure of VP37 predicted by JPred server [25]. VP37 is predicted to contain two domains, N-terminal and C-terminal domain linked together through a flexible linkage. The N-terminal domain of VP37 is started from Met1- Leu104 and C-terminal domain is started from Glu124 to Thr281.

0.1 M H₂SO₄ to each well, and the absorbance was read immediately at 650 nm using a microplate reader (Biorad, CA, USA). Similarly, *in vitro* binding assay of truncated VP37 proteins (VP37₍₁₁₁₋₂₈₁₎ and VP37₍₁₋₂₅₀₎) and shrimp haemocytes were performed in the same manner as mentioned above. However, only an optimized concentration of soluble truncated VP37 proteins (0.2 mg/ml) was used for 96-wells plate coating.

2.5. Inhibitory assay

To investigate the inhibitory effect of SG on the binding of VP37 to shrimp haemocytes, VP37₍₁₋₂₈₁₎ and VP37₍₁₁₁₋₂₈₁₎ were adjusted to the same concentration (0.2 mg/ml) and individually incubated with two different concentrations (0.1 and 1 mg/ml) of SG, which had been prepared by the method previously described [15], at 4 °C for 4 h (designated as VP37-SG). The inhibitory assay was performed in triplicates. Prior to the inhibition assay, shrimp haemocytes were prepared and coated as described above. After blocking with 5% BSA in PBS at 4 °C for 16 h, each well was incubated with different mixtures of VP37-SG at 4 °C for 4 h, washed with PBS twice before adding HRP-conjugated anti-His antibody (1:4000 in PBS) and incubated for 2 h. Following a washing with PBS, 100 µl TMB substrate was added to all

wells. The reaction was stopped after 5 min in the dark at room temperature by adding 100 µl of 0.1 M H₂SO₄ to each well, and the absorbance was read immediately at 650 nm using a microplate reader (Biorad, CA, USA).

2.6. Surface plasmon resonance analysis

We used Surface plasmon resonance (SPR) to investigate the interaction between VP37₍₁₋₂₈₁₎ with heparin from porcine intestinal mucosa (H3393, Sigma, Saint Louis, USA). SPR measurement was performed on Biacore T200 instrument with a constant flow rate of 5 µl/min. Heparin was dissolved in 20 mM Sodium phosphate (pH 7.4) and 150 mM NaCl to 5 mg/ml. One milliliter of heparin solution was incubated with 25 µl of 50 mM biotin-hydrazide (Thermo scientific, Waltham, USA) and 15 µl of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) (100 mg/ml) for 2 h at 25 °C. The heparin was then dialyzed overnight into 20 mM Sodium phosphate (pH 7.4) and 150 mM NaCl and 100 µl injected over flow cell 2 of a streptavidin-coated SA chip (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) until the response increased 200 RU. Flow cell 1 was left as a control surface.

Channel 1 and 2 of a streptavidin-coated SA chip (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) were equilibrated with HBS buffer before injection of

Table 1
Primers used in this study.

Construct name	Nucleotide sequence (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Size of amplicon
VP37-Full length	F/CGGGATCCGCGGTAAACTTGGATAATGTTCT R/CCGCTCGAGTTATGTCCAACAATTTAAAAGAAGTAGATGA	55	843 bp
VP37-C terminal domain (111–281)	F/CGGGATCCGCGGTAAACTTGGATAATGTTCT R/CCGCTCGAGTTATTGTTGGGTATTAAAAACCATATTACCTTC	55	513 bp
VP37-C terminal domain disrupted (1–250)	F/CGGGATCCGCGGATTTTACTGGACCGAA R/CCGCTCGAGTTATGTCCAACAATTTAAAAGAAGTAGATGA	55	750 bp

Underlined and bold typefaces represent restriction sites.

TEV-cleaved VP37₍₁₋₂₈₁₎. The level of specific binding was obtained from a subtraction of the response from channel 2 from that of channel 1. After each injection, both channels were regenerated with a 20 µl/min of 5 M NaCl. This procedure led to recovery of the original baseline and regenerated a heparin surface that could bind reproducibly to subsequent injections of VP37₍₁₋₂₈₁₎. The binding data were analyzed using the BIAevaluation software (version 2.0) to determine the binding affinity. To investigate the inhibitory effect of SG on the interaction between VP37 and heparin, SG was dissolved in HBS buffer to different concentrations (0, 0.8, 1.6, and 3.2 µM) pre-incubated with 100 nM of VP37₍₁₋₂₈₁₎ for 1 h at room temperature before Biacore measurements were taken as described above.

2.7. Kinetics analysis of sensogram data

As the molecular mass of porcine heparin is not homogenous, the sensogram data was fitted by using a heterogeneous ligand binding model.



where A = VP37 concentration, B = porcine heparin concentration. Two sets of K_a and K_d (the association and dissociation rate constants) describe the binding of VP37 to heparins of different sizes. The rate constant set of lower K_d value was used to calculate the possible highest affinity using the equation below.

$$R_{eq} = \frac{K_A CR_{max}}{K_A C + 1}$$

where:

R_{eq} = Response unit at equilibrium state

C = Concentration of VP37

R_{max} = (Molecular weight of VP37/Molecular weight heparin) × immobilized ligand level.

$K_A = K_a/K_d$

K_D = Binding affinity ($1/K_A$)

2.8. Statistical analysis

The binding assay using ELISA-based technique was performed in triplicate ($n = 3$). The data are presented as mean ± standard deviation (SD) of three experiments. The differences among the values were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple test and statistical significance established by (*) $P < 0.05$. Normality of the data in these experiments were confirmed by Shapiro-Wilk test where p-Value is higher than 0.05. Since the data was taken for triplicate experiments, continuity analysis was omitted.

3. Results

3.1. Expression and purification of VP37 proteins

Based on the secondary structural analysis in JPred server [25], VP37 was predicted to consist of an N-terminal domain linked with C-terminal domain through a long flexible region (Fig. 1). In accordance with this, the nucleotide sequence encoding for VP37₍₁₋₂₈₁₎, VP37₍₁₁₁₋₂₈₁₎ and VP37₍₁₋₂₅₀₎, that represented full length, C-terminal domain VP37 and C-terminal domain disrupted VP37 respectively, were separately cloned into a pET15b-thioredoxin vector. SDS-PAGE analysis of the protein fractions, eluted from Gel filtration chromatography corresponding to the peaks at 76 ml, 83 ml and 80 ml for VP37₍₁₋₂₈₁₎, VP37₍₁₁₁₋₂₈₁₎ or VP37₍₁₋₂₅₀₎ respectively (Fig. 2A), revealed that VP37₍₁₋₂₈₁₎, VP37₍₁₁₁₋₂₈₁₎ or VP37₍₁₋₂₅₀₎ were successfully expressed as a soluble form with a molecular weight of approximately 48, 34 and 47 kDa, respectively (Fig. 2B). Western blot was performed following

separation of 48, 34 and 47 kDa proteins by gel filtration. The result revealed that anti-His antibody could react with these protein bands (Fig. 2C), confirming successful VP37 proteins expression and purification. In addition, major symmetric peaks observed from gel filtrations of the three VP37 proteins indicated high degree of uniformity in the conformation of these proteins (Fig. 2A). We also made the construct encoding for N-terminal domain (residue 1–104) alone. Unfortunately, the N-terminal domain was expressed in an insoluble form. The fact that the C-terminal domain disrupted VP37, which contained the complete region of N-terminal domain and part of C-terminal domain, expressed effectively in soluble form suggested that the region from residue 124–250 of C-terminal domain might have the function of helping to stabilize the structure of N-terminal domain so that it becomes more stable in a solution.

3.2. C-terminal domain of VP37 is required for the binding to shrimp haemocytes

We investigated the interaction of the obtained VP37 proteins and shrimp haemocytes by using ELISA assay. The binding levels were presented by OD₆₅₀ value (Fig. 3). The results clearly showed that the full length version of VP37 can bind to shrimp haemocytes at all three tested recombinant protein concentrations (0.05, 0.2 and 0.5 mg/ml) while control group using thioredoxin resulted in no interaction (Fig. 3A). The highest OD₆₅₀ value (0.14 ± 0.02) was observed at the latter protein concentration used while lowest OD₆₅₀ value ($\sim 0.07 \pm 0.01$) obtained from 0.05 mg/ml of protein concentration. Thus, 0.2 mg/ml was chosen as an optimized concentration for a later ELISA assay using three different versions of VP37 proteins. The similar interaction level was observed in both VP37₍₁₋₂₈₁₎ and VP37₍₁₁₁₋₂₈₁₎ (OD₆₅₀ $\sim 0.11 \pm 0.02$) while a significantly lower binding level was observed with VP37₍₁₋₂₅₀₎ (OD₆₅₀ = 0.05 ± 0.01). These results suggest that the binding of VP37 to shrimp haemocytes requires the C-terminal domain. No interaction was observed in the negative control using thioredoxin (Fig. 3B).

3.3. The binding of VP37 to shrimp haemocytes is inhibited by sulfated galactan

Kanokpan et al. observed sulfated galactan (SG) extracted from red seaweed reduced the mortality of shrimp in WSSV infection [15]. How SG prevents WSSV infection in shrimp is still unclear. In this experiment, we investigated whether SG can inhibit the binding of VP37 to shrimp haemocytes by pre-incubating VP37 with SG of different concentrations. We found that when VP37₍₁₋₂₈₁₎ and VP37₍₁₁₁₋₂₈₁₎ were individually pre-incubated with SG at different concentrations (0.1 and 1 mg/ml) prior to performing the interaction assay, the binding level of both tested recombinant VP37 proteins reduced significantly. Interestingly, both VP37₍₁₋₂₈₁₎ and VP37₍₁₁₁₋₂₈₁₎ showed a similar inhibitory profile, suggesting that the C-terminal domain might responsible for haemocytes binding. No interaction was observed in all control groups using thioredoxin (Fig. 4).

3.4. The interaction between VP37 and heparin

Several studies have demonstrated that heparin plays a role in viral infection by serving as a receptor for attachment. Interestingly, heparin has been identified in whiteleg shrimps [22,24]. Since the binding of VP37 to shrimp haemocytes can be blocked by SG, we suspected that VP37 might be able to recognize sulfated polysaccharide as its binding target and possibly it might use heparin presented on the surface of shrimp cells to serve as its receptor. In this experiment, we tested the binding of VP37 to porcine heparin, whose structure was reportedly similar to those found in shrimps [24]. We used Surface plasmon resonance (SPR) to investigate the ability of VP37₍₁₋₂₈₁₎ to bind to a heparin-coated SA chip. Here, we passed different concentrations of

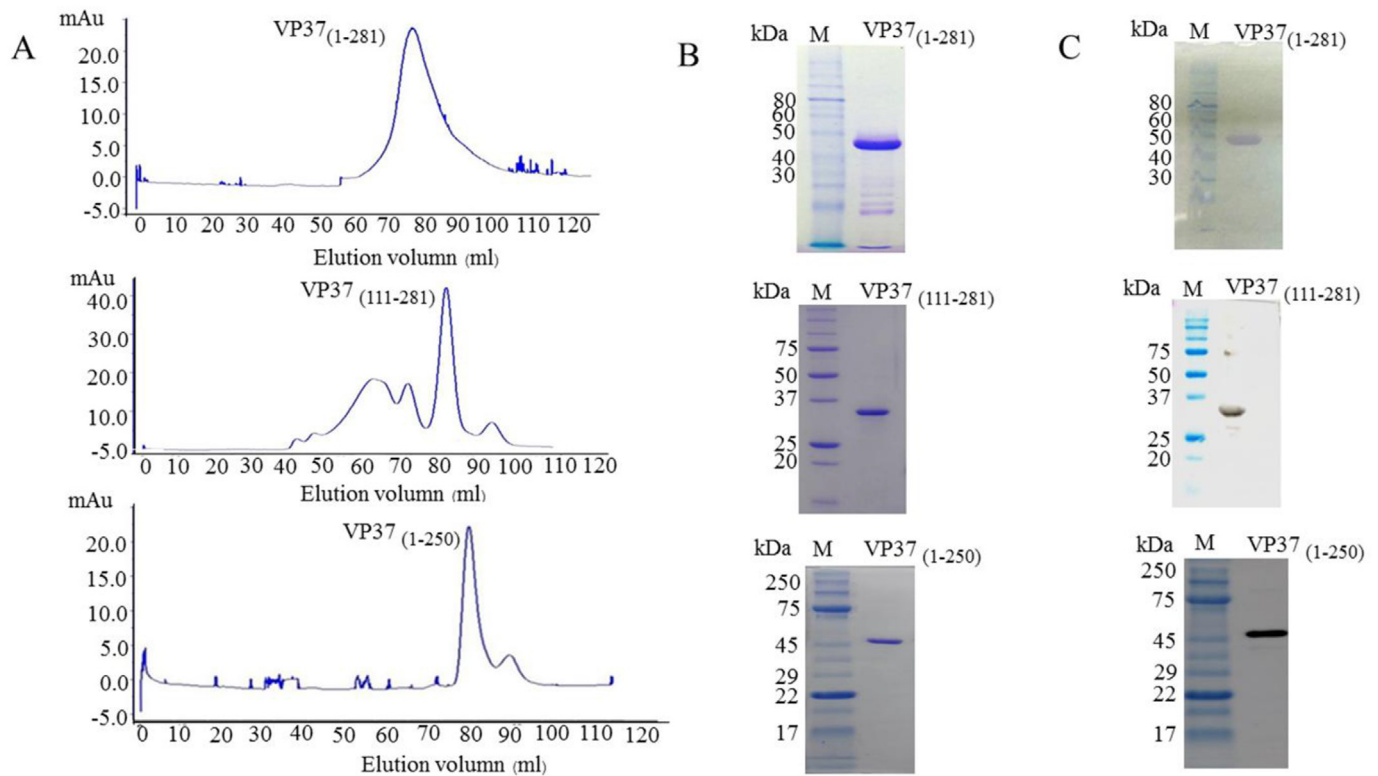


Fig. 2. (A) Gel-filtration analysis of VP37₍₁₋₂₈₁₎, VP37₍₁₁₁₋₂₈₁₎ and VP37₍₁₋₂₅₀₎. (B) SDS-PAGE analysis of the purified VP37 proteins. (C) Western blot analysis of VP37 proteins. The proteins were detected by anti-His antibody.

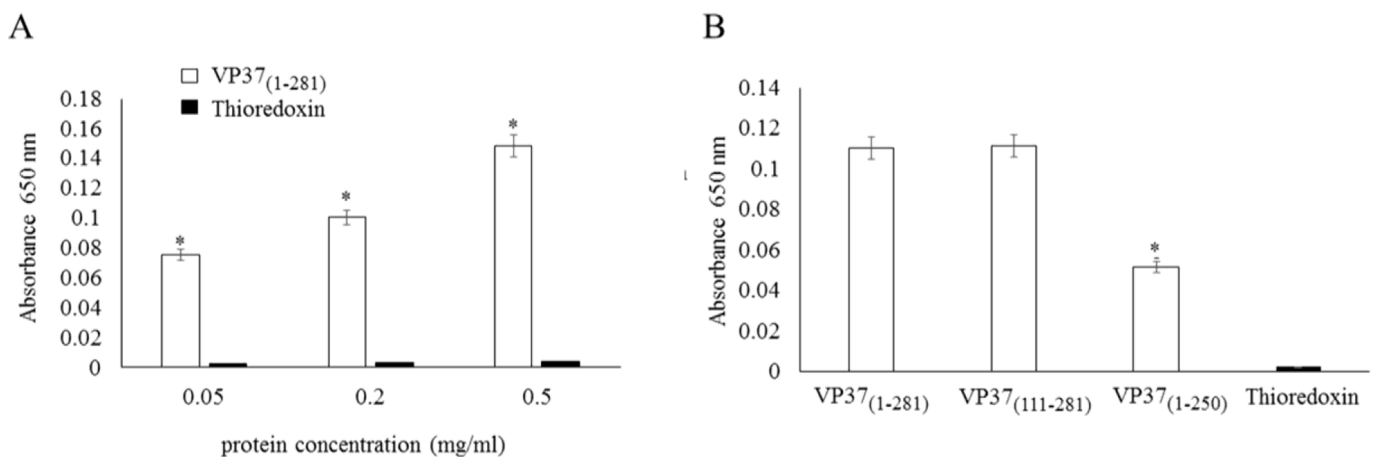


Fig. 3. The binding of VP37 to shrimp haemocytes was determined by ELISA assay. (A) Different concentrations of VP37₍₁₋₂₈₁₎ was tested for shrimp haemocytes binding. (B) Comparison of the shrimp haemocytes binding observed in VP37₍₁₋₂₈₁₎, VP37₍₁₁₁₋₂₈₁₎, and VP37₍₁₋₂₅₀₎ at 0.2 mg/ml. This experiment was performed in triplicate ($n = 3$). The data are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD) of three separate experiments. The differences among the values were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple test and statistical significance established by (*) $P < 0.05$.

rVP37₍₁₋₂₈₁₎ over a heparin-coated surface, measuring the binding and dissociation of the protein from the chip. As shown in Fig. 5A, the binding of VP37₍₁₋₂₈₁₎ to the heparin chip, expressed as response unit (RU), increased with increases in concentration of VP37. The data was fitted to the heterogeneous ligand model.

In the ELISA assay, SG was seen to be able to inhibit the binding between VP37 and shrimp haemocytes. We then used SPR to investigate whether or not SG can also inhibit the binding of VP37 to heparin. In doing so, VP37₍₁₋₂₈₁₎ at a concentration of 100 nM was pre-incubated with different concentrations of SG before the binding to a heparin-coated SA chip was assessed. While VP37₍₁₋₂₈₁₎ alone showed the highest binding signal of 75 RU, the binding signal produced from the

SG-pre-incubated VP37₍₁₋₂₈₁₎ decreased with the increases in concentration of SG (Fig. 5B). Our results clearly demonstrated that VP37 can interact with heparin and that the interaction between VP37 and heparin can be blocked by SG.

4. Discussion

Binding of envelope proteins on the surface of shrimp cells is critical for WSSV infection [4,5,8,9,26]. Understanding of the protein interaction between shrimp and virus might uncover the disease pathogenesis for the development of effective intervention controls. In case of WSSV, several structural proteins such as VP28 and VP37 are believed to be

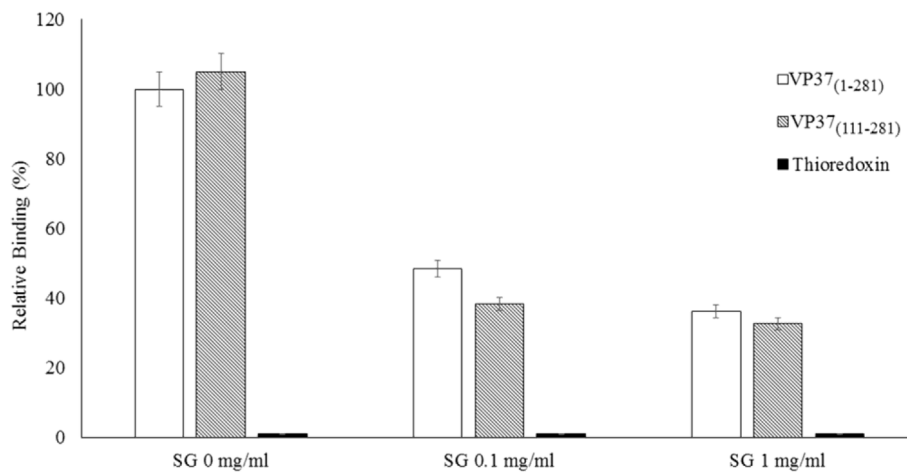


Fig. 4. The inhibitory effect of SG on the binding of VP37 proteins to shrimp haemocytes. VP37₍₁₋₂₈₁₎ and VP37₍₁₁₁₋₂₈₁₎ were individually pre-incubated with SG of different concentrations prior to subjected to binding assay. Thioredoxin served as a negative control. This experiment was performed in triplicate ($n = 3$). The data are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD) of three separate experiments.

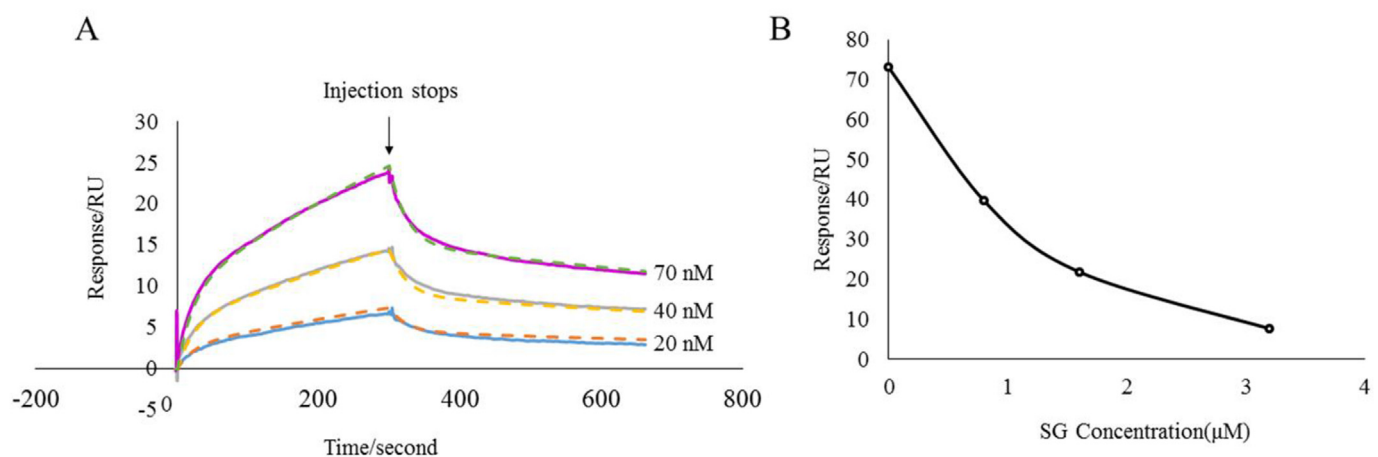


Fig. 5. The binding of VP37₍₁₋₂₈₁₎ to heparin-coated SA chip on Surface plasmon resonance system. (A) Porcine heparin was coupled to the surface of a SA chip, and the binding was measured, and expressed as response unit (RU), after the injection of 20 nM, 40 nM and 70 nM of VP37₍₁₋₂₈₁₎ through the chip surface. The experimental data (lines) were fitted to the simulated data (dashed lines) based on heterogeneous ligand model. The K_D of the VP37 binding to heparin is 1.0 μ M. (B) Inhibitory experiment was performed by pre-incubating 100 nM VP37₍₁₋₂₈₁₎ with different concentrations of SG before the assessment of binding to a heparin.

important for facilitating the virus during attachment onto the shrimp cells [3,7,8]. For VP37, it has been identified as an envelope protein of WSSV in 2002 [6] and later studies have revealed that VP37 is involved in the attachment of WSSV virions to the shrimp cells [5,7–9]. Characterization of VP37 suggested the protein used F1ATP synthase beta subunit (BP53) as a receptor [27]. However, the purification of VP37 and BP53 involved the use of guanidine to solubilize the proteins. Hence, whether or not the denatured proteins, especially BP53, successfully refolded back to its native form is still in doubt. In this study, we successfully expressed and purified three versions of VP37 proteins, full-length VP37 (VP37₍₁₋₂₈₁₎), C-terminal domain of VP37 (VP37₍₁₁₁₋₂₈₁₎) and C-terminal domain disruption of VP37 (VP37₍₁₋₂₅₀₎) in a soluble form in *E. coli* without having to denature the proteins. These VP37 proteins enabled us to investigate the region of VP37 that is important for interacting with shrimp haemocytes. According to our results, we can confirm that VP37 is capable of binding to shrimp haemocytes, which is consistent with the observation in a previous study [10]. We also showed that C-terminal domain of VP37 is an important region for binding to shrimp haemocytes. Disruption of the C-terminal domain resulted in weaker haemocytes binding of VP37 (Fig. 3B). VP37 was reported previously to interact with other envelope proteins including VP26 and VP28 [28]. Since VP37 does not have transmembrane helix, in order to be able to present on the viral envelope, it is possible that VP37 might interact with either VP26 or VP28 through its N-terminal domain to form a protein complex, or infectome [29,30],

having the C-terminal domain protruding outward allowing it to bind to shrimp haemocytes.

Interestingly, we found that the binding of VP37 to shrimp haemocytes can be inhibited by SG from red seaweed. This is consistent with the report by Kanokpan et al. (2014) that WSSV infection in shrimp can also be prevented by SG [15]. These observations reflect the fact that VP37 might be able to recognize SG as its binding partner and that the binding of VP37 to shrimp haemocytes might target a molecule whose structure is related to SG. SG is a highly sulfated polysaccharide having galactose as a major repeating unit [15]. Recently, heparin, a highly sulfated polysaccharide, was also found in shrimp [22–24]. This raised the question whether heparin on the surface of shrimp cells served as receptor for WSSV. When we tested VP37 for binding to porcine heparin, whose ^1H NMR structural profile is similar to that found in shrimp [24], in SPR, VP37 was shown to actively bind to porcine heparin with the K_D of 1.0 μ M. This clearly indicated that VP37 can interact with heparin. Based on our results, we have speculated that heparin might serve as a receptor for WSSV and the binding of VP37 to heparin might be important for WSSV infection. Previous studies reported on the therapeutic effect of SG in preventing WSSV infection [15]. The same group also showed that the binding of WSSV to SG was largely dependent on the sulfate groups found on SG molecules [17]. We then proposed that SG reduces WSSV infection in shrimps by interfering the binding of VP37 to a sulfated molecule found in shrimp such as heparin. This view was confirmed when we saw that SG

effectively inhibited the binding of VP37 to heparin on SPR. As seen in some viruses [31–33], it is possible that heparin-like molecules on the surface of shrimp cells might play a role as coreceptor responsible for recruitment of WSSV on the shrimp cells and therefore facilitate the secondary interaction of adjacent molecules with higher binding affinity to their receptors. Especially since VP37 was reported to be able to interact with VP26 and VP28 [28], these envelope proteins might come together to form a higher structure so called infectome [29,30], possibly having VP37 for interacting with heparin-like molecules as a primary interaction that guides the virus into the shrimp cells by facilitating secondary interaction possibly performed by either VP26 or VP28.

In summary, our data suggest that VP37 uses its C-terminal domain in order to bind with shrimp haemocytes. Having seen that VP37 can interact with heparin, and the binding of VP37 to both shrimp haemocytes and heparin can be inhibited by SG, we propose that VP37 utilizes heparin-like molecules as an attachment molecule. Notably, the inhibitory assay on SPR developed in this study might open the way for screening natural compounds that can prevent WSSV infection by targeting the interaction between VP37 and heparin.

Acknowledgements

This research was financially supported by Thailand Research Fund (TRF No. MRG5980197) and we would to thank Charoen Pokphand Foods PCL for providing the experimental shrimp.

References

- [1] M.A. Mayo, Virus taxonomy – Houston, Arch. Virol. 147/5 (2002) 1071–1076.
- [2] Peter J. Walker, James R. Winton, Emerging viral diseases of fish and shrimp, Vet. Res. 41 (2010) 51, <http://dx.doi.org/10.1051/vetres/2010022>.
- [3] Mariëlle C.W. van Hulten, Jeroen Witteveldt, Marjolein Snippe, Just M. Vlak, White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp, Virology 285 (2010) 228–233.
- [4] Xixian Xie, Feng Yang, Interaction of white spot syndrome virus VP26 protein with actin, Virology 336 (2005) 93–99.
- [5] Yan Liang, Jie Huang, Xiao-Ling Song, Pei-Jun Zhang, Huai-Su Xu, Four viral proteins of white spot syndrome virus (WSSV) that attach to shrimp cell membranes, Dis. Aquat. Org. 66 (2005) 81–85.
- [6] Canhua Huang, Xiaobo Zhang, Qingsong Lin, Xun Xu, Choy(-) L. Hew, Characterization of a novel envelope protein (VP281) of shrimp white spot syndrome virus by mass spectrometry, J. Gen. Virol. 83 (2002) 2385–2392.
- [7] Wenlin Wu, Lei Wang, Xiaobo Zhang, Identification of White spot syndrome virus (WSSV) envelope proteins involved in shrimp infection, Virology 332 (2005) 578–583.
- [8] Q.-H. Liu, X.-L. Zhang, C.-Y. Ma, Y. Liang, J. Huang, VP37 of white spot syndrome virus interact with shrimp cells, Lett. Appl. Microbiol. 48 (2009) 44–50.
- [9] Wenbin Zhan, Xiaolu Wang, Yanyan Chi, Xiaoqian Tang, The VP37-binding protein F₁ATP synthase β subunit involved in WSSV infection in shrimp *Litopenaeus vannamei*, Fish Shellfish Immunol. 34 (2013) 228–235.
- [10] Liu Qing-hui, Huang Jie, Han Wen-jun, Liang Yan, Lu Chun-ling, Wang Qing-yin, Aquaculture 258 (2006) 55–62.
- [11] Shijun Xie, Xiaojun Zhang, Jiquan Zhang, Fuhua Li, Jianhai Xiang, Envelope protein of white spot syndrome virus (WSSV) interact with *Litopenaeus vannamei* Peritrophin-Like protein (LvPT), PLoS One 10 (12) (2015), <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0144922> e0144922.
- [12] M. Witvrouw, E. De Clercq, Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs, Gen. Pharmacol. 29 (1997) 497–511.
- [13] Wilaiwan Chotigeat, Suprapa Tongsupa, Kidchakan Supamataya, Amornrat Phongdara, Effect of fucoidan on disease resistance of Black tiger shrimp, Aquaculture 233 (2004) 23–30.
- [14] Kyoko Hayashi, Takahisa Nakano, Minoru Hashimoto, Kenji Kanekiyo, Toshimitsu Hayashi, Defensive effects of a fucoidan from brown alga *Undaria pinnatifida* against herpes simplex virus infection, Int. J. Immunopharm. 8 (2008) 109–116.
- [15] Kanokpan Wongprasert, Tawut Rudtanatip, Jantana Praiboon, Immunostimulatory activity of sulfated galactan isolated from the red seaweed *Gracilaria fisheri* and development of resistance against white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp, Fish Shellfish Immunol. 36 (2014) 52–60.
- [16] Nuttarin Sirisutananon, Jiann-Chu Chen, Yong-Chin Lin, Su-Tuen Yeh, Chyng-Hwa Liou, Li-Li Chen, Su Sing Sim, Siau Li Chiew, Dietary administration of a *Gracilaria tenuistipitata* extract enhances the immune response and resistance against *Vibrio alginolyticus* and White spot syndrome virus in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*, Fish Shellfish Immunol. 31 (2011) 848–855.
- [17] Tawut Rudtanatip, Somluk Asuvapongpatana, Boonsirm Withyachumnarnkul, Kanokpan Wongprasert, Sulfated galactan isolated from the red seaweed *Gracilaria fisheri* target the envelope proteins of white spot syndrome virus and protect against viral infection in shrimp haemocytes, J. Gen. Virol. 95 (2014) 1126–1134.
- [18] Jeffrey D. Esko, Koji Kimata, Ulf Lindahl, Essentials of Glycobiology, second ed.s., Cold Spring Harbor, New York, 2009.
- [19] S.M. de Boer, J. Kortekaas, C.A.M. de Haan, P.J.M. Rottier, R.J.M. Moormann, B.J. Bosch, Heparan sulfate facilitates Rift Valley fever virus entry into the cell, J. Virol. 86 (2012) 13767–13771.
- [20] Santanu Bose, Amiya K. Banerjee, Role of heparan sulfate in Human Parainfluenza Virus type 3 infection, Virology 298 (2002) 73–83.
- [21] Raphaële Germi, Jean-Marc Crance, Daniel Garin, Josette Guimet, Hugues Lortat-Jacob, Rob W.H. Ruigrok, Jean-Pierre Zarski, Emmanuel Drouet, Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and Yellow fever virus, Virology 292 (2002) 162–168.
- [22] Adriana S. Brito, Dayse S. Arimatéia, Lucilla R. Souza, Marcelo A. Lima, Vanessa O. Santos, Valquíria P. Medeiros, Paula A. Ferreira, Rodrigo A. Silva, Carmen V. Ferreira, Giselle Z. Justo, Edda L. Leite, Giuliana P.V. Andrade, Fernanda W. Oliveira, Helena B. Nader, Sueli F. Chavante, Anti-inflammatory properties of a heparin-like glycosaminoglycan with reduced anti-coagulant activity isolated from a marine shrimp, Bioorg. Med. Chem. 16 (2008) 9588–9595.
- [23] Jiangcheng Chen, Shuhei Yamada, Yoshiki Hama, Ajaya Kumar Shetty, Takanari Kobayashi, Hiroshi Oda, Kosuke Seiki, Eunmi Kim, Takashi Kimura, Naonori Takahashi, Kazuya I.P.J. Hidari, Takashi Suzuki, Kazuyuki Sugahara, Unique heparan sulfate from shrimp head exhibits a strong inhibitory effect on infections by dengue virus and Japanese encephalitis virus, Biochem. Biophys. Res. Commun. 412 (2011) 136–142.
- [24] Sueli F. Chavante, Adriana S. Brito, Marcelo Lima, Edwin Yates, Helena Nader, Marco Guerrini, Giangiacomo Torri, Antonella Bisio, A heparin-like glycosaminoglycan from shrimp containing high levels of 3-O-sulfated S-glucosamine groups in an unusual trisaccharide sequence, Carbohydr. Res. 390 (2014) 59–66.
- [25] Alexey Drozdetskiy, Christian Cole, James Procter, Geoffrey J. Barton, JPred4: a protein secondary structure prediction server, Digitol Repository 43 (2015) W389–W394 <https://doi.org/10.1093/nar/gkv332>.
- [26] Kallaya Sritunyalucksana, Wanphen Wannapapho, Chu Fang Lo, Timothy W. Flegel, PmRab7 is a VP28-binding protein involved in White spot syndrome virus infection in shrimp, J. Virol. 80 (2006) 10734–10742.
- [27] Chen Li, Xiao-Xiao Gao, Lie Huang, Yan Liang, Studies of the viral binding proteins of shrimp BP53, a receptor of white spot syndrome virus, J. Invertebr. Pathol. 134 (2015) 48–53.
- [28] Qing-Hui Liu, Cui-Yan Ma, Wen-Bo Chen, Xiu-Li Zhang, Yan Liang, Shuang-Lin Dong, Jie Huang, White spot syndrome virus VP37 interact with VP28 and VP26, Dis. Aquat. Org. 85 (2009) 23–30.
- [29] Yun-Shiang Chang, Wang-Jing Liu, Cheng-Chung Lee, Tsung-Lu Chou, Yuan Ting Lee, Tz-Shian Wu, Jiun Yan Huang, Wei-Tung Huang, Tai-Lin Lee, Guang-Hsiung Kou, Andrew H.-J. Wang, Chu Fang Lo, A 3D model of the membrane protein complex formed by the white spot syndrome virus structural proteins, PLoS One 5 (5) (2010), <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0010718> e10718.
- [30] Po-Yu Huang, Jiann-Horng Leu, Li-Li Chen, A newly identified protein complex that mediates white spot syndrome virus infection via chitin-binding protein, J. Gen. Virol. 95 (2014) 1799–1808.
- [31] Chang-chao Huan, Yue Wang, Bo Ni, Rui Wang, Li Huang, Xiao-feng Ren, Guang-zhi Tong, Chan Ding, Hong-jie Fan, Xiang Mao, Porcine epidemic diarrhea virus uses cell-surface heparan sulfate as an attachment factor, Arch. Virol. 160 (2015) 1621–1628.
- [32] Carolin Dräger, Martin Beer, Sandra Blome, Porcine complement regulatory protein CD46 and heparan sulfates are the major factors for classical swine fever virus attachment *in vitro*, Arch. Virol. 160 (2015) 739–746.
- [33] Estela Escribano-Romero, Miguel Angel Jimenez-Clavero, Paula Gomes, Juan Antonio García-Ranea, Victoria Ley, Heparan sulfated mediates swine vesicular disease virus attachment to the host cell, J. Gen. Virol. 85 (2004) 663–953.