



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำ :
ลักษณะสมบัติของโปรตีนที่ตอบสนองต่อเชื้อไวรัสและการจำแนก miRNA
ที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กุลยา สมบูรณ์วิวัฒน์

กรกฎาคม 2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำ :
ลักษณะสมบัติของโปรตีนที่ตอบสนองต่อเชื้อไวรัสและการจำแนก miRNA
ที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

ผู้วิจัย

สังกัด

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กุลยา สมบูรณ์วิวัฒน์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว.และต้นสังกัดไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RSA5580024

ชื่อโครงการ : การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำ : ลักษณะสมบัติของโปรตีนที่ตอบสนองต่อเชื้อไวรัสและการจำแนก miRNA ที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

ชื่อนักวิจัย : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กุลยา สมบูรณ์วิวัฒน์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address : kunlaya.s@chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 16 กรกฎาคม 2555 – 15 กรกฎาคม 2558

กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* เป็นสปีชีส์ที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งของประเทศไทย แต่การระบาดของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวทำให้เกิดความเสียหายต่อเศรษฐกิจอย่างมาก ทั้งนี้เพื่อศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งต่อเชื้อไวรัส ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาลักษณะสมบัติของโปรตีน viral responsive protein 15 (*PmVRP15*) ที่มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นหลังจากกุ้งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว และค้นหาและศึกษาลักษณะสมบัติของ miRNA ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสในกุ้ง เมื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmVRP15* โดยเทคนิค RNA interference ในกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว พบว่าการแสดงออกของยีนไวรัสตัวแดงดวงขาว และอัตราการตายของกุ้งลดลง ซึ่งให้เห็ว่ายีน *PmVRP15* มีความสำคัญกับการเพิ่มจำนวนไวรัสในกุ้ง และยังพบว่าโปรตีน WSV399 สามารถจับกับโปรตีน *PmVRP15* ด้วยตรวจสอบด้วยเทคนิค Yeast two-hybrid และ Co-immunoprecipitation เมื่อหาตำแหน่งบนไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วย เทคนิค immunoblotting analysis และ immunoelectron microscopy พบว่าโปรตีน WSV399 เป็นโปรตีนโครงสร้างที่อยู่ในส่วนของ Tegument นอกจากนี้ได้ศึกษาการควบคุมการแสดงออกของยีน *PmVRP15* โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์และศึกษาลักษณะสมบัติของโปรโมเตอร์ของยีน *PmVRP15* จากนั้นทำการหาส่วนที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน พบว่าบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -525 ถึง -428 และ ตำแหน่ง -287 ถึง -209 น่าจะเป็นบริเวณที่มี repressor และ activator มาจับและควบคุมการแสดงออกของยีนตามลำดับ จากนั้นใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ และใช้เทคนิค Site-directed mutagenesis ในการตรวจสอบตำแหน่งที่มีผลต่อการแสดงออกของยีน จากผลการทดลองพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง - 525 ถึง -428 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะกับ interferon regulatory factor (IRF) ซึ่งคาดว่าทำหน้าที่เป็น repressor ในการควบคุมการแสดงออกของยีน *PmVRP15* และ บริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -287 ถึง -209 พบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะกับ octamer transcription factor (Oct-1) และ nuclear factor of activated T cells (NFAT) ที่คาดว่าทำหน้าที่เป็น activator ในการควบคุมการแสดงออกของยีน *PmVRP15* งานวิจัยอีกส่วนหนึ่งได้ทำการค้นหาไมโครอาร์เอ็นเอ (microRNA; miRNA) ซึ่งเป็น RNA ขนาดเล็กที่ทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการต่างๆ ในสิ่งมีชีวิตรวมถึงระบบภูมิคุ้มกัน โดยใช้เทคนิค Next generation sequencing โดยสามารถระบุชนิดของ miRNA homolog ที่แสดงออกในเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ 46 ชนิด เมื่อวิเคราะห์การแสดงออกของ miRNA homolog ที่สนใจจำนวน 16 ชนิดด้วยเทคนิค Stem-loop real-time RT-PCR พบว่ามี miRNA 11 ชนิดที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปหลังจากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว และ miRNA 2 ชนิด ได้แก่ pmo-miR-317 และ pmo-miR-750 มีระดับการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปอย่างมาก จากการทำนายยีนเป้าหมายของ miRNA ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ พบว่า miRNA สามารถจับกับบริเวณ 5'UTR ORF และ 3'UTR ของยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง เช่นยีนในโปรแกรมการตายของเซลล์ เปปไทด์ต้านจุลชีพ ระบบโพพีนอลออกซิเดส โปรตีนเนส ตัวยับยั้งโปรตีนเนส การสื่อสารของเซลล์ และโปรตีนฮิสทอน จากนั้นศึกษาหน้าที่ของ pmo-bantam ที่มีความอนุรักษ์ในสิ่งมีชีวิตด้วย Luciferase reporter assay พบว่า pmo-bantam สามารถควบคุมการแสดงออกของ Kunitz-type serine protease inhibitor (KuSPI) โดยจับที่บริเวณ 3'UTR ของยีนเป้าหมายได้ การแสดงออกของ pmo-bantam และยีนเป้าหมาย KuSPI ในอวัยวะนำเหลืองของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว มีความสอดคล้องกัน จากผลการทดลองข้างต้นสรุปได้ว่า miRNA มีหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกยีนในระบบภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสในกุ้ง

คำหลัก : กุ้งกุลาดำ; ระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัส; ไวรัสตัวแดงดวงขาว; Viral responsive protein 15; microRNA

Abstract

Project Code : RSA5580024

Project Title : Study of antiviral immunity of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon* : Characterization of a viral responsive gene and identification of miRNAs involved in WSSV infection

Investigator : Assistant Professor Dr. Kunlaya Somboonwiwat Chulalongkorn University

E-mail Address : kunlaya.s@chula.ac.th

Project Period : 16 July 2012 – 15 July 2015

Penaeus monodon is one of an important species for shrimp aquaculture in Thailand. However, viral infectious disease caused by white spot syndrome virus (WSSV) is vital to shrimp leading to economic collapse. To gain more knowledge on shrimp defense against viral infection, in this study, we characterized a viral responsive protein 15 (*PmVRP15*), the highly up-regulated gene identified in hemocyte of WSSV-infected shrimp with unknown function, as well as identified and characterized miRNAs that are involved in antiviral response. RNAi-mediated silencing of *PmVRP15* gene in WSSV-infected shrimp showed a significant decrease in WSSV gene expression and the cumulative mortality of WSSV-infected shrimp suggesting its important role in viral propagation. The interaction between *PmVRP15* and a WSSV protein, WSV399, was identified by yeast two-hybrid screening and co-immunoprecipitation (Co-IP). Immunoblotting analysis (*in vitro*) and immunoelectron microscopy (*in vivo*) identified WSV399 as the tegument protein. Moreover, the regulation of *PmVRP15* gene expression was studied by identification and characterization the promoter sequences. Promoter deletion assay identified (-525/-428) and (-287/- 209) nucleotide positions as repressor and activator binding sites, respectively. The computational analysis and site directed mutagenesis revealed that the repressor binding site (-525/-428) is regulated by interferon regulatory factor (IRF) and activator binding sites in (-287/-209) region are regulated by octamer transcription factor (Oct-1) and nuclear factor of activated T cells (NFAT). Moreover, microRNAs (miRNAs), a small RNA that functions in regulating various biological processes including immune system, were identified by Next generation sequencing. Forty-six miRNAs homologs that are expressed in WSSV-infected *P. monodon* hemocyte were identified and 16 interested miRNAs were analyzed for the expression profile by stem-loop real-time PCR. Eleven out of 16 miRNAs were differently expressed upon WSSV infection. Two miRNAs, pmo-miR-315 and pmo-miR-750, were highly responsive miRNAs upon WSSV infection. The target mRNAs focusing on immune-related genes of the identified miRNAs in *P. monodon* were predicted by in-house software against *P. monodon* EST database. From the prediction, miRNAs were targeted at 5'UTR, ORF and 3'UTR regions of several immune-related gene involved in apoptosis, antimicrobial peptides, prophenoloxidase system, proteinase and proteinase inhibitor, signaling transduction and heat-shock protein. To characterize the miRNA function, regulation of Kunitz-type serine protease inhibitor (KuSPI) by pmo-bantam which is highly conserved among organisms was analyzed by luciferase reporter assay. Correlation of pmo-bantam and KuSPI expression was revealed in lymphoid organ of WSSV-infected shrimp. These results implied that miRNA might play roles as immune gene regulators in shrimp antiviral response.

Keywords : *Penaeus monodon*; Antiviral immunity; White spot syndrome virus; Viral responsive protein 15 (*PmVRP15*); microRNA

1. บทนำ

อุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งเป็นแหล่งรายได้ที่สำคัญของประเทศไทย โดยการส่งออกกุ้งมีมูลค่ามากกว่าสองพันล้านดอลลาร์สหรัฐในปี 2009 ดังนั้นการพัฒนาการเลี้ยงกุ้งอย่างยั่งยืนจึงสำคัญต่อเศรษฐกิจไทยอย่างยิ่ง อย่างไรก็ตามการเลี้ยงกุ้งในปัจจุบันประสบปัญหาโรคติดเชื้อในกุ้งโดยเฉพาะการติดเชื้อไวรัสที่สำคัญ เช่น ไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus; WSSV) ไวรัสหัวเหลือง (Yellow head virus; YHV) และไวรัสทอรา (Taura syndrome virus; TSV) ส่งผลกระทบต่อ การเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย ดังนั้นความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการต้านทานเชื้อไวรัสจึงสำคัญต่อการพัฒนาแนวทางการควบคุมโรคในกุ้งให้มีประสิทธิภาพ

ไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายคู่ จัดอยู่ในตระกูล *Nimaviridae* จีโนส *Whispovirus* ปัจจุบันได้ทราบลำดับเบสของจีโนมไวรัสตัวแดงดวงขาวที่พบในไทย จีน และไต้หวัน ซึ่งลำดับเบสของไวรัสจากทั้งสามแหล่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนร่วมกันสูงถึง 99.3% ไวรัสตัวแดงดวงขาวสามารถติดเชื้อได้ในกุ้งทุกชนิดรวมถึงสัตว์กลุ่ม *crustaceans* ชนิดอื่นๆ เช่น ปู ลิอบสเตอร์ เป็นต้น เมื่อกุ้งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจะทำให้กุ้งตาย 100% ภายใน 3-10 วันหลังติดเชื้อ ในปัจจุบันเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวยังคงเป็นไวรัสที่ก่อโรครุนแรง และเป็นปัญหาสำคัญต่ออุตสาหกรรมกุ้ง

กุ้งมีระบบภูมิคุ้มกันแบบที่มีมาแต่กำเนิด (*innate immune system*) 1) การตอบสนองโดยอาศัยเซลล์ประกอบด้วย *phagocytosis* *nodule formation* และ *encapsulation* และ 2) การตอบสนองโดยน้ำเลือดประกอบด้วย *clotting system* *prophenoloxidase system* และการสร้างสารออกฤทธิ์ต่างๆ เช่น เปปไทด์ต้านจุลชีพ *protease* และ *proteinase inhibitor* (Bachère 2000; Donpudsa et al. 2010; Tassanakajon et al. 2011) อย่างไรก็ตามข้อมูลของกลไกต้านทานไวรัสในกุ้งมีอยู่น้อยเนื่องจากข้อจำกัดในการศึกษาได้แก่ การขาดลำดับเบสของจีโนมกุ้ง และการขาดเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีความเสถียรเพียงพอสำหรับการศึกษาแบบ *in vitro*

การศึกษากลไกการต้านทานไวรัสใน *Drosophila* ซึ่งเป็นโมเดลในการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดมีมานานกว่าทศวรรษ ระบบภูมิคุ้มกันนี้ตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสโดยเกิดการส่งสัญญาณกระตุ้นการทำงานของวิถีต่างๆเพื่อกำจัดไวรัสรวมถึงวิถีการยับยั้งการแสดงออกของยีนด้วยอาร์เอ็นเอขนาดเล็กเพื่อตอบสนองต่อเชื้อไวรัส ปัจจุบันได้มีการค้นพบยีนที่ถูกกระตุ้นเมื่อมีการติดเชื้อไวรัสและยีนที่มีการแสดงออกเพื่อให้กุ้งสามารถอยู่รอดในสภาวะที่มีการติดเชื้อไวรัส จากการวิเคราะห์ *microarray* ของกุ้ง *P. monodon* ที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและเชื้อไวรัสหัวเหลือง จากการทำ *suppression subtractive cDNA libraries* ของกุ้ง *P. monodon* ที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้พบยีนชนิดหนึ่ง ให้ชื่อว่า *virus responsive protein (PmVRP15)* ซึ่งมีการแสดงออกสูงหลังจากติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นอกจากนั้นยังพบว่ายีน *PmVRP15* แสดงออกสูงในเนื้อเยื่อต่างๆของกุ้ง ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือด เหยือก หัวใจ และอวัยวะน้ำเหลือง ในกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (Prapavorarat et al. 2010) งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาการทำงานของโปรตีน *PmVRP15* และการควบคุมยีนนี้เพื่อให้เข้าใจหน้าที่ของยีนมากขึ้น

Double-stranded RNA (dsRNA) ทั้งจากที่เซลล์สร้างขึ้นและที่ได้รับจากภายนอกสามารถเกิดกระบวนการ *RNA interference (RNAi)* ซึ่งเป็นหนึ่งในวิถีการควบคุมการแสดงออกของยีนโดยอาศัยอาร์เอ็นเอขนาดเล็ก และความจำเพาะของลำดับเบส *RNA silencing* มีบทบาททั้งในการควบคุมการแสดงออกของยีนและ

กระบวนการต้านทานไวรัสในพืชและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง แตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีการตอบสนองของ pan-antiviral interferon ซึ่งมีวิวัฒนาการสูงกว่าการใช้ RNA silencing กระบวนการ RNAi ใน *Drosophila* ถูกค้นพบแล้ว 3 วิธี ได้แก่ small interfering RNA (siRNA) microRNA (miRNA) และ Piwi-interacting (piRNA) (Fullaondo and Lee 2012) ส่วนในกิ้งก่ามีการค้นพบโปรตีนหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับ RNAi ยีนหลายชนิดในสิ่งมีชีวิตสามารถถูกยับยั้งได้โดยการฉีด dsRNA ที่จำเพาะต่อยีนเข้าสู่สิ่งมีชีวิต ซึ่งการฉีด dsRNA ที่จำเพาะต่อยีนของไวรัสสามารถป้องกันการแพร่กระจายของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสในกิ้งก่าได้ (Saksmerprome et al. 2009; Yodmuang et al. 2006)

microRNA (miRNA) เป็นอาร์เอ็นเอที่ไม่แปลรหัส มีขนาด 20-22 นิวคลีโอไทด์ ทำหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีน การสังเคราะห์เริ่มจาก primary miRNA (pri-miRNA) ถอดรหัสโดย RNA polymerase II ในนิวเคลียส จากนั้นผ่านกระบวนการต่างๆ ได้เป็น precursor miRNA (pre-miRNA) แล้วถูกส่งออกไปไซโทพลาสซึมโดย exportin 5 และถูกตัดโดย RNase III enzyme Dicer ได้เป็น miRNA duplex ขนาดประมาณ 21 นิวคลีโอไทด์ หลังจากนั้น mature miRNA จะเข้ารวมกับ RNA-induced silencing complex (RISC) ซึ่งสามารถไปควบคุม mRNA เป้าหมายโดยเข้าคู่กับ mRNA เป้าหมายบริเวณ 3'UTR ส่งผลให้เกิดการสลายของ RNA หรือ การยับยั้งการแปลรหัส miRNA ถูกค้นพบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ซึ่งมีบทบาทในพัฒนาการและกระบวนการทำงานของร่างกายรวมถึงระบบภูมิคุ้มกัน งานวิจัยพบว่า miRNA ควบคุมระบบภูมิคุ้มกันโดยตอบสนองต่อส่วนประกอบของแบคทีเรีย เช่น Lipopolysaccharide (LPS) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบ miRNA ทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น miR-24 และ miR-93 ในหนูควบคุมการแสดงออกของโปรตีน vesicular stomatitis virus (VSV) และ miRNA อื่นๆ ที่ยับยั้งการ replication ของ human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) โดยจับที่บริเวณจีโนมของไวรัส เช่น miR-28 miR-125b miR-150 miR-223 และ miR-382

งานวิจัยเกี่ยวกับ miRNA ในกิ้งก่ามีการตีพิมพ์ครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2554 โดยมีการค้นพบ miRNA 35 ชนิดในเซลล์เม็ดเลือดของกิ้งก่า *Masupenaues japonicus* ซึ่ง 15 ชนิดมีความคล้ายคลึงกับ miRNA ในสัตว์กลุ่ม arthropod ที่เหลืออีก 20 ชนิดคาดว่า เป็น miRNA ที่ยังไม่มีมีการค้นพบมาก่อน นอกจากนั้นยังพบว่ามี miRNA 22 ชนิดมีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปเมื่อกิ้งก่าติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว จึงคาดว่า miRNA น่าจะมีบทบาทสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันของกิ้งก่า (Ruan et al. 2011) จากนั้นในปี พ.ศ. 2555 มีการศึกษา miRNA ในกิ้งก่า *M. japonicus* ที่ติดเชื้อไวรัสเป็นเวลา 0, 6, 24, และ 48 ชั่วโมง โดยใช้วิธี small RNA sequencing พบ miRNA ของกิ้งก่า 63 ชนิด โดย 31 ชนิดมีการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญในการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสซึ่งมี 25 ชนิดที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นและ 6 ชนิดที่มีการแสดงออกลดลง นอกจากนั้นได้มีการทำนายยีนเป้าหมายด้วย TargetScan และ miRanda algorithm พบว่าเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (Huang et al. 2012) หลังจากนั้นมีการศึกษาหน้าที่ของ miRNA ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันมากขึ้น และพบว่า miRNA ที่ค้นพบควบคุมยีนในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด ได้แก่ phagocytosis, apoptosis และ ระบบ pro-phenoloxidase (Huang et al. 2014; Yang et al. 2012) นอกจากนี้ยังมีการศึกษา miRNA ของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่มีผลต่อการติดเชื้อในกิ้งก่าพบว่า miRNA ของไวรัสสามารถควบคุมยีนของไวรัสเองแล้วส่งผลให้กระตุ้นการติดเชื้อมากขึ้น (He et al. 2014; He and Zhang 2012) และในปี พ.ศ. 2557 มีการศึกษา miRNA ในกิ้งก่า (*Litopenaeus vannamei*) ด้วยวิธี Solexa deep sequencing, cross-species miRNA microarray และการค้นหา miRNA จากฐานข้อมูล ESTs ของกิ้งก่าโดยใช้ miRNA ที่อนุรักษ์จาก miRBase เป็น query ซึ่งได้ค้นพบ miRNA 394 ชนิดที่มีการอนุรักษ์และพบ miRNA 20 ชนิดที่ไม่ยังคงมีการค้นพบ

แม้จะมีการศึกษาเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งอย่างแพร่หลาย ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสของระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดก็ยังไม่เพียงพอ งานวิจัยนี้สนใจที่จะค้นหาการตอบสนองต่อไวรัสในกุ้งที่ควบคุมโดยกระบวนการ RNA interference และกลไกที่ถูกเหนี่ยวนำขึ้นเพื่อต้านเชื้อไวรัส ดังนั้นผู้วิจัยมีจุดประสงค์ที่จะศึกษาลักษณะของโปรตีน PmVRP15 ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีการตอบสนองสูงในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว และระบุชนิด miRNA ซึ่งเป็นโมเลกุลที่สำคัญในกระบวนการ RNA interference ซึ่งน่าจะควบคุมการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้ง

2. วิธีการทดลอง

2.1 ศึกษาหน้าที่ของ *PmVRP15* ต่อการการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งกุลาดำ โดยเทคนิค RNAi และ protein-protein interaction assay

2.1.1 ตรวจสอบระดับการแสดงออกยีนของไวรัสตัวแดงดวงขาวหลังจากทำการยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmVRP15*

สร้าง double stranded RNA (dsRNA) ที่มีความจำเพาะกับยีน *PmVRP15* (ไพรเมอร์ *PmVRP15-T7-F/PmVRP15-R* และ *PmVRP15-T7-R/PmVRP15-F*) และยีน GFP (ไพรเมอร์ *GFPT7-F/GFP-R* และ *GFPT7-R/GFP-F*) (ตารางที่ 2.1) โดย dsRNA GFP ใช้สำหรับการทดลองควบคุม โดยใช้ T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production Systems (Promega) นำกึ่งกุลาดำสุขภาพดีขนาด 3-5 กรัม จำนวน 9 ตัวต่อกลุ่ม ฉีด dsRNA ในปริมาณ 20 ไมโครกรัมต่อกรัมกึ่ง หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง ทำการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ในปริมาณที่ทำให้กึ่งตาย 100% ภายในเวลา 3 วัน พร้อมกับ dsRNA ปริมาณ 20 ไมโครกรัมต่อกรัมกึ่ง หลังจากกึ่งติดเชื้อไวรัสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงเก็บตัวอย่างเลือดกึ่ง โดยรวมกึ่ง 3 ตัวเข้าด้วยกันโดยจะถือว่าเป็น 1 ชุด สกัดอาร์เอ็นเอและเปลี่ยนเป็น cDNA สายแรก โดยใช้ First-strand cDNA synthesis kit (Fermentas) จากนั้นทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *PmVRP15* โดยใช้เทคนิค RT-PCR และ Real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *PmVRP15* (*PmVRP15-F/R* สำหรับ RT-PCR และ *PmVRP15-qrt-F/R* สำหรับ Real-time PCR) (ตารางที่ 2.1) เพื่อตรวจสอบความสามารถของ *PmVRP15dsRNA* ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmVRP15* และในการทดลองนี้ศึกษาระดับการแสดงออกของยีนของไวรัสซึ่งเป็นยีนโครงสร้างของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่มีการแสดงออกจำเพาะในแต่ละช่วงการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmVRP15* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนของไวรัส ได้แก่ คู่ไพรเมอร์ VP28-F/R สำหรับ RT-PCR และ VP28-qrt-F/R สำหรับ Real-time PCR (ตารางที่ 2.1) เพื่อตรวจสอบยีน VP28 (Late phase) คู่ไพรเมอร์ WSSV477-F/R สำหรับ RT-PCR และ WSSV477-qrt-F/R สำหรับ Real-time PCR (ตารางที่ 2.1) เพื่อตรวจสอบยีน WSSV477 (Early phase) และคู่ไพรเมอร์ ie1-F/R สำหรับ RT-PCR และ ie1-qrt-F/R สำหรับ Real-time PCR (ตารางที่ 2.1) เพื่อตรวจสอบยีน ie-1 (Immediate early phase) และใช้คู่ไพรเมอร์ EF-1-F/R (ตารางที่ 2.1) ในการตรวจหายีน EF-1 α ซึ่งใช้เป็น Internal control

ตารางที่ 2.1 คู่มือไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองตรวจสอบระดับการแสดงออกยีนของไวรัสตัวแดงดวงขาวหลังจากการยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmVRP15*

Primer name	Sequence (5'→3')
EF-1-F	GGTGCTGGACAAGCTGAAGGC
EF-1-R	CGTTCCGGTGATCATGTTCTTGATG
GFP-F	ATGGTGAGCAAGGGGGAGGA
GFP-R	TTACTTGTACAGCTCGTCCA
GFP-FT7	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGATGGTGAGCAAGGGGGAGGA
GFP-RT7	GGATCCTAATACGACTCACTATAGG TTACTTGTACAGCTCGTCCA
<i>PmVRP15</i> -T7-F	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCGCGACCGAGCCAAGAG
<i>PmVRP15</i> -T7-R	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGTGAGCTGACGGAAGGCC
<i>PmVRP15</i> -F	CGATCACCACTCTCGTTCTT
<i>PmVRP15</i> -R	GTACTAACAGCGAACCCATC
VP28-F	TCACTCTTTCGGTCGTGTCTG
VP28-R	CCACACACAAAGGTGCCAAC
VP28-qrt-F	GGGAACATTCAAGGTGTGGA
VP28-qrt-R	GGTGAAGGAGGAGGTGTTGG
ie1-qrt-F	AGCAAGTGGAGGTGCTATGT
ie1-qrt-R	CCATGTGATCAGTCTCTTC
477-qrt-F	GGCCAAGTCATGGAGATCTA
477-qrt-R	CCATCCACTTGTTGCAGTA

2.1.2 การค้นหาโปรตีนจากงูกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เกิดอันตรกิริยากับโปรตีน *PmVRP15* โดยใช้เทคนิค **Yeast-two-hybrid screening**

2.1.2.1 สร้าง library ของยีนจากเม็ดเลือดของงูกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

เตรียม total RNA จากเซลล์เม็ดเลือดของงูกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เวลา 6 และ 48 ชั่วโมง นำมาใช้ในการสร้าง library ด้วย Make Your Own “Mate & Plate™” Library System (Clontech) นำ total RNA ที่เตรียมได้ 2 µg โดยนำมาจากตัวอย่างละ 1 µg มาสร้าง first strand cDNA โดยใช้ oligo-dT primer สร้าง ds-cDNA โดยเพิ่มจำนวนยีนด้วยเทคนิค LD-PCR นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ CHROMA SPIN™ TE-400 (Clontech) จากนั้นนำไปแทรนส์ฟอร์มเข้าสู่เซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ Y187 คัดเลือกแทรนส์ฟอร์มแมนที่บนอาหารแข็ง synthetic dropout ที่ขาดกรดอะมิโน leucine (SD/-Leu) และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3-4 วัน จากนั้นเก็บโคลนทั้งหมดใน freezing medium และแบ่ง library เป็นหลอด ๆ ละ 1 mL

2.1.2.2 เตรียม bait plasmid สำหรับการทำ yeast two-hybrid screening

ทำการเพิ่มจำนวนยีน *PmVRP15* ส่วน ORF ยีน *PmVRP15* เฉพาะส่วนที่เป็นปลาย N (*PmVRP15-N*) และปลาย C (*PmVRP15-C*) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับส่วนของยีน *PmVRP15* แต่ละส่วน ซึ่งไพรเมอร์ Forward จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะกับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และไพรเมอร์ Reverse จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะกับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (ตารางที่ 2.2) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ และพลาสมิด pGBKT7 ซึ่งเป็น bait vector มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *EcoRI* จากนั้นโคลนชิ้นยีน *PmVRP15* แต่ละชิ้นเข้าสู่พลาสมิด pGBKT7 ได้เป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGBKT7-*PmVRP15* pGBKT7-N-*PmVRP15* และ pGBKT7-C-*PmVRP15* ตามลำดับ และแทรนส์ฟอร์มเข้าสู่ *Escherichia coli* โดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ทำการคัดโคลนรีคอมบิแนนท์ที่สามารถเจริญได้บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะ kanamycin นำโคลนรีคอมบิแนนท์มาเลี้ยงเพิ่มจำนวนเพื่อสกัดพลาสมิด และนำไปตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอม-บิแนนท์พลาสมิด สำหรับนำไปทำ Yeast two-hybrid screening ต่อไป

ตารางที่ 2.2 คู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ Yeast-Two-hybrid screening และยืนยันปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน W399 กับ *PmVRP15*

Primer name	Sequence (5'→3')
N-VRP15-NdeI-F	GCGCATATGTTAACAGAGACTTAGTAAACCTG
N-VRP15-EcoRI-R	GTGCTGAATTCTTATGTTGAGACGAATGGTATGG
C-VRP15-NdeI-F	GCGCATATGTATGCTAGGGGGAAGTTCAAA
C-VRP15-EcoRI-R	GCTCGGAATTCTAAATGCTCTACTGACATGTTGTG
WSV399-XhoI-F	CGCCTCGAGGTTCCAGAAATGGTTTGAATCGTT
WSV399-EcoRI-R	GCCGAATTCGCTTTGTTTGATAATACAATTTTCACCTTGT

2.1.3.3 การทดสอบ autoactivation และ toxicity ของ bait plasmid

แทรนส์ฟอร์ม pGBKT7-*PmVRP15* pGBKT7-N-*PmVRP15* และ pGBKT7-C-*PmVRP15* 100 ng เข้าสู่เซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ Y2H Gold ตามรายละเอียดใน Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System (Clontech) แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง synthetic dropout ที่ขาดกรดอะมิโน tryptophan (SD/-trp) SD/-trp ที่มี X-alpha-Gal (SDO/X) และ SD/-trp ที่มี X-alpha-Gal และ aureobasidin A (SDO/X/A) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3-5 วัน ถ้าหากผลที่ได้ถ้าเกิดโคโลนีสีฟ้าแสดงว่า *PmVRP15* pGBKT7-N-*PmVRP15* และ pGBKT7-C-*PmVRP15* ที่สนใจสามารถกระตุ้นการแสดงออกของ reporter gene ของยีสต์ได้ด้วยตัวเอง จะไม่สามารถนำ pGBKT7-*PmVRP15* pGBKT7-N-*PmVRP15* และ pGBKT7-C-*PmVRP15* ไปศึกษาต่อได้ ดังนั้นรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ไม่ทำให้เกิด autoactivation จึงจะนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป หลังจากนั้นทำการทดสอบความเป็นพิษของ pGBKT7-*PmVRP15* pGBKT7-N-*PmVRP15* และ pGBKT7-C-*PmVRP15* โดยแทรนส์ฟอร์ม pGBKT7-*PmVRP15* pGBKT7-N-*PmVRP15* และ pGBKT7-C-*PmVRP15* และ pGBKT7 100 ng เข้าสู่เซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ Y2H Gold เช่นเดียวกับการทำ autoactivation แต่

เลี้ยงบนอาหารแข็ง SD/-trp เท่านั้น บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3-5 วัน ถ้า pGBKT7-*PmVRP15* pGBKT7-N-*PmVRP15* และ pGBKT7-C-*PmVRP15* ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ยีสต์ ขนาดและจำนวนโคโลนีของเซลล์ที่มีเวกเตอร์ pGBKT7 และ pGBKT7-*PmVRP15* pGBKT7-N-*PmVRP15* และ pGBKT7-C-*PmVRP15* ควรจะใกล้เคียงกัน

2.1.3.4 การทำ Yeast two-hybrid screening

ในการทดลองนี้ได้ใช้ยีน *PmVRP15* 3 แบบ คือ ORF ของ *PmVRP15* (*PmVRP15*) และยีน *PmVRP15* เฉพาะส่วนที่เป็นปลาย N (*PmVRP15*-N) และ เฉพาะส่วนที่เป็นปลาย C (*PmVRP15*-C) ซึ่งจะทำให้การหาโปรตีนที่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน *PmVRP15* ในสองกลุ่มโปรตีน คือกลุ่มโปรตีนในเซลล์เม็ดเลือดกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว และกลุ่มโปรตีนไวรัสตัวแดงดวงขาว เริ่มจากนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGBKT7-*PmVRP15* pGBKT7-N-*PmVRP15* และ pGBKT7-C-*PmVRP15* ทรานฟอร์มเข้าสู่ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ Y2H gold จากนั้นนำไป mate กับ library ของยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ Y187 ที่มียีนที่พบในเม็ดเลือดกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว และ library ของยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ AH109 ที่มียีนของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่อยู่ในยีสต์ (ร่วมมือกับ ดร.แสงจันทร์ เสนาปิน) โดยจะทำการคัดเลือกหาโปรตีนที่เกิดปฏิสัมพันธ์กัน โดยนำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง double dropout ที่ไม่มีกรดอะมิโน leucine และ tryptophan (SD/-Leu/-Trp/X) โดยจะมี X- α -gal เป็นซับสเตรทของ α -galactosidase ซึ่งจะช่วยให้คัดเลือกโคลนยีสต์ที่ต้องการ โดยจะคัดเลือกโคโลนีที่มีสีฟ้า จากนั้นทำการยืนยันโดยนำโคโลนียีสต์ที่ได้ไปคัดเลือกอีกครั้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง high stringency quadruple dropout ที่ไม่มีกรดอะมิโน leucine tryptophan adenine และ histidine (SD/-Leu/-Trp/-Ade/-His/X/A) โดยจะมี X- α -gal และยา Aureobasidin A จากนั้นนำโคลนของยีนที่ได้มา segregate จนได้เป็นโคโลนีเดี่ยว ทำการสกัดพลาสมิดออกจากเซลล์ยีสต์ และนำไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ต่อไป

2.1.3.5 การยืนยันการเกิดปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนที่สนใจด้วยวิธี Co-transformation

นำพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ที่มียีนที่พบว่าโปรตีนเกิดปฏิสัมพันธ์กับ *PmVRP15* มาแทรนส์ฟอร์มร่วมกับเวกเตอร์ pGBKT7 หรือ pGBKT7-*PmVRP15* หรือ pGBKT7-N-*PmVRP15* หรือ pGBKT7-C-*PmVRP15* และนำมาคัดเลือกโคลนบนอาหารแข็งชนิด SD/-Leu/-Trp/X และ SD/-Leu/-Trp/-Ade/-His/X/A ถ้าโคโลนีของยีสต์ที่มีพลาสมิดจากโคลนที่สนใจและเวกเตอร์ pGBKT7 มีการแสดงออกของยีน reporter บน SD/-Leu/-Trp/-Ade/-His/X/A ได้ ถือว่าเป็นการเกิดอันตรปฏิกิริยาที่ไม่ถูกต้อง (false positive)

2.1.4 ศึกษาการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน *PmVRP15* กับ โปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาว ด้วยเทคนิค Co-immunoprecipitation (CO-IP)

ทำการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ *PmVRP15* ในระบบของ *E. coli* นำโคลนที่มีพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ pET22b+*PmVRP15* มาผลิตโปรตีนโดยนำโคโลนีเดี่ยวของโคลนมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มียาแอมพลิซิลิน เป็นเวลาข้ามคืน เขย่า 250 rpm ที่ 37 °C จากนั้นนำเชื้อที่ลงไว้ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ จน OD₆₀₀ มีค่าประมาณ 0.4 จากนั้นเหนี่ยวนำให้มีการผลิตโปรตีนโดยเติม IPTG ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 mM เหนี่ยวนำให้เซลล์ผลิตโปรตีนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการปั่นเก็บเซลล์ด้วยความเร็ว 5000xg 10 นาที นำ

เซลล์ไปทำให้แตกโดยการ Freeze-Thaw 3 ครั้ง และใช้เครื่อง Sonicator จากนั้นแล้วปั่นแยกเก็บส่วนที่เป็น Inclusion bodies ทำการละลายโปรตีนออกมาด้วย 8M urea และนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย Ni- column และวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ Western blot

2.1.4.1 ทำการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ WSV399 ในระบบของ *E. coli*

ผลิตพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ WSV399 สำหรับผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ WSV399 โดยทำการเพิ่มจำนวนยีน WSV399 โดยใช้คู่มือที่จำเพาะกับยีน WSV399 (ตารางที่ 2.2) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จดจำโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* และ *EcoRI* ที่ด้านปลาย 5' และ ปลาย 3' ของยีนตามลำดับ จากนั้นทำการโคลนชิ้นยีนที่ตัดด้วยเอนไซม์ *XhoI* และ *EcoRI* เข้าสู่เวกเตอร์ pBAD/Myc-His A และนำพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ที่ได้ทรานฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* TOP10 (Invitrogen) เพื่อผลิตโปรตีน นำโคโลนีเดียวของโคลนรีคอมบิแนนท์ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มียาแอมพลิซิลิน เป็นเวลาข้ามคืนเขย่า 250 รอบต่อนาทีที่ 37 °C จากนั้นนำเชื้อที่ลงไว้ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ จน OD₆₀₀ มีค่าประมาณ 0.5 จากนั้นเหนี่ยวนำให้เซลล์ผลิตโปรตีนโดยใช้ L-Arabinose ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.2% เลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำการปั่นเก็บเซลล์ด้วยความเร็ว 5000xg 10 นาที นำเซลล์ไปทำให้แตกโดยการ Freeze-Thaw 3 ครั้ง และใช้เครื่อง Sonicator แล้วปั่นแยกเพื่อเก็บส่วนที่เป็น Soluble และนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย Ni- column และนำวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ Western blot

2.1.4.2 ศึกษาการเกิดปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน *PmVRP15* และ WSV399 ด้วยเทคนิค Co-Immunoprecipitation

นำโปรตีนรีคอมบิแนนท์ *PmVRP15* และ WSV399 มาผสมกันบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำ co-immunoprecipitation โดยใช้ ProFound™ c-Myc Tag IP/Co-IP Kit (Thermo Scientific) โดยนำโปรตีนที่ผสมกันแล้วไปบ่มกับ agarose bead ที่ติดด้วย anti-c-Myc ในคอลัมน์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นปั่นเอาโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ออก และทำการล้างคอลัมน์ สุดท้ายทำการชะ โปรตีนที่จับกับคอลัมน์ออกมา และนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ Western blot

2.1.5 ตรวจสอบการแสดงออกของยีนของไวรัส WSV399 ในเลือดกิ้งก่าหลังติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

เนื่องจากต้องการตรวจสอบการแสดงออกของยีนไวรัสตัวแดงดวงขาว WSV399 ในเลือดกิ้งก่าดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ระยะเวลาต่างๆ โดยเริ่มจากนำกิ้งก่าดำที่ปลอดเชื้อขนาดประมาณ 15 กรัมจำนวน 25 ตัว นำมาฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในปริมาณที่ทำให้กิ้งก่าตาย 100% ภายในเวลา 5 วันหลังจากติดเชื้อ ทำการเก็บเลือดกิ้งก่าที่เวลา 0 3 6 12 24 36 และ 48 ชั่วโมงหลังติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยจะเก็บเวลาละ 3 ตัว จากนั้นนำมาสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ TRI Reagent® (Molecular Research Center) จากนั้นทำการกำจัด DNA ด้วยเอนไซม์ DNase (New England Biolabs) นำอาร์เอ็นเอทั้งหมด 1 µg มาสร้าง cDNA ด้วย First-strand cDNA synthesis kit (Fermentus) จากนั้นทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนไวรัสตัวแดงดวงขาว WSV399 โดยจะเปรียบเทียบกับยีน marker ของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่มีการแสดงออกในระยะต่างๆหลัง

กุ่มกุลาดำติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ประกอบด้วย ยีน ie-1 มีการแสดงออกในระยะ Immediate early ยีน WSV477 มีการแสดงออกในระยะ Early และยีน vp28 มีการแสดงออกในระยะ Late และใช้ยีน EF-1 α เป็น internal control ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย cDNA (1:5 dilution) 1 μ l 1xPCR buffer dNTP 0.1 μ M คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะของแต่ละยีน 0.2 μ M ได้แก่ คู่ไพรเมอร์ wsv399-F/R สำหรับยีน wsv399 คู่ไพรเมอร์ ie1-F/R สำหรับยีน ie-1 คู่ไพรเมอร์ wsv477-F/R สำหรับยีน wsv477 คู่ไพรเมอร์ vp28-F/R สำหรับยีน vp28 และคู่ไพรเมอร์ EF-1 α -F/R สำหรับยีน EF-1 α (ตารางที่ 2.3) เอนไซม์ Taq DNA polymerase (RBC Bioscience) 1.25 Unit โดยจะใช้ PCR condition ดังนี้ Pre-denature 94 °C 2 นาที จากนั้นเข้าสู่ PCR cycle Denature step 94 °C 15 วินาที, Annealing step 60 °C 30 วินาที, Extension step 72 °C 30 วินาที จำนวน 30 รอบ และ Final extension 72 °C 5 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis

ตารางที่ 2.3 แสดงคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีนของไวรัสตัวแดงดวงขาว

Primer name	Sequence (5'→3')
EF-1 α -F	GGTGCTGGACAAGCTGAAGGC
EF-1 α -R	CGTTCCGGTGATCATGTTCTTGATG
ie1-F	GACTCTACAAATCTCTTTGCCA
ie1-R	CTACCTTTGCACCAATTGCTAG
wsv477-F	CGCGGATCCATGTATATCTTCGTCGA
wsv477-R	CCGGAATTCTTATAAGAAATGTACAA
vp28-F	TCACTCTTTCGGTCGTGTCTG
vp28-R	CCACACACAAAGGTGCCAAC
wsv399-F	CGCCTCGAGGTTCCAGAAATGTTTTGAATCGTT
wsv399-R	GCCGAATTCGCTTTGTTTGATAATACAATTTTCACCTTG
pET16b-WSV399-NdeI-F	GCAGCCATATG-TTCCAGAAATGTTTTGAATCGT
pET16b-WSV399-BamHI-R	GCAGCGGATCCTTATTTGTTTGATAATACAATTTTCACCT

2.1.6 ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนบนไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยเทคนิค Western blot และ Immunoelectron microscopy

2.1.6.1 ผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ WSV399 และทำให้บริสุทธิ์ เพื่อนำไปผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะกับ WSV399

เนื่องจากต้องการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน WSV399 เพื่อนำไปศึกษาการแสดงออกของโปรตีน WSV399 บนไวรัสตัวแดงดวงขาว จึงต้องทำการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ WSV399 (rWSV399) เริ่มจากการสร้างพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ wsv399 โดยทำการเพิ่มจำนวนยีน wsv399 ด้วยเทคนิค PCR นำพลาสมิด pGADT7-WSV399 ที่ได้จากการทำ Yeast two-hybrid screening มาเป็น template ใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน wsv399 ที่ออกแบบให้มีเอนไซม์ตัดจำเพาะ NdeI และ BamHI (New England Biolabs) สำหรับไพรเมอร์ Forward (pET16b-WSV399-NdeI-F: 5' GCAGCCATATGTTCCAGAAATGTTTTGAATCGT 3') และ Reverse (pET16b-WSV399-BamHI-R: 5' GCAGCGGATCCTTATTTGTTTGATAATACAATTTTCAC

CT 3') ตามลำดับ และใช้เอนไซม์ KOD Taq polymerase (TOYOBO) โดยจะใช้ PCR condition ดังนี้ Pre-denature 94 °C 2 นาที จากนั้นเข้าสู่ PCR cycle Denature step 94 °C 30 วินาที, Annealing step 55 °C 30 วินาที, Extension step 68 °C 30 วินาที จำนวน 30 รอบ และ Final extension 72 °C 5 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis นำผลิตภัณฑ์ PCR มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Gel/PCR DNA fragments extraction kit (Geneaid) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR และ เวกเตอร์ pET16b (Novagen) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *BamHI* จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Gel/PCR DNA fragments extraction kit (Geneaid) และ เชื่อมเวกเตอร์ pET16b กับยีน wsv399 เข้าด้วยกันโดยใช้เอนไซม์ Ligation High Ver. 2 (TOYOBO) บ่มที่ 16 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำเข้าสู่ *E. coli* DH5 α (RBC Bioscience) ด้วยวิธี CaCl₂-transformation และคัดเลือกโคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET16b-wsv399 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB agar) ที่มียาแอมพลิซิลิน 100 μ g/ μ l (LB-amp) นำโคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET16b-wsv399 ไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน wsv399 ด้วยเทคนิค DNA sequencing

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET16b-wsv399 (rpET16b-wsv399) เข้าสู่ *E. coli* BL21 (DE3) เพื่อทำการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ WSV399 (rWSV399) เริ่มจากการนำโคลนีเดี่ยวของ *E. coli* BL21 (DE3) ที่มี rpET16b-wsv399 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-amp ที่ 37 °C ขำคิน เพื่อเป็น starter จากนั้นนำ starter มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-amp ใหม่ (ในอัตราส่วน 1:100) 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จนได้ OD₆₀₀ ประมาณ 4-5 ทำการเหนี่ยวนำให้มีการผลิต rWSV399 โดยการใส่ Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 mM หลังจากนั้น 4 ชั่วโมงจะเก็บเซลล์ *E. coli* ทั้งหมดโดยจะนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 $\times$ g เป็นเวลา 10 นาที ละลายเซลล์ในบัฟเฟอร์ 1 $\times$ PBS, pH 7.4 และทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่อง Sonicator จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนตะกอน (Inclusion bodies) มาละลายใน 1 $\times$ PBS, pH 7.4 ที่มี 1.5% N-Lauroylsarcosine sodium salt (Sigma) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA bead (Qiagen) ทำการบ่มโปรตีนกับ Ni-NTA bead ที่ถูกทำให้อิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ 1 $\times$ PBS, pH 7.4 ที่ 4 °C ขำคิน จากนั้นล้างโปรตีนที่ไม่จับกับ Ni-NTA bead ออกด้วยบัฟเฟอร์ 1 $\times$ PBS, pH 7.4 และนำ Ni-NTA bead ที่จับกับ rWSV399 ไปวิเคราะห์ด้วย 12.5% SDS-PAGE ทำการวัดปริมาณโปรตีนโดยการเทียบกับปริมาณโปรตีน BSA มาตรฐานที่นำไปวิเคราะห์บน 12.5% SDS-PAGE เดียวกัน โดยโปรตีน rWSV399 ที่บริสุทธิ์จะถูกตัดออกจาก 12.5% SDS-PAGE และส่งไปผลิต antibody ใน mouse ต่อไป

2.1.6.2 ขั้นตอนการทำไวรัสให้บริสุทธิ์จาก fresh water crayfish (*Procambarus clarkii*) ที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

ในการทดลองนี้ใช้ crayfish, *P. Clarkii* ขนาด 20-25 g ที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นเวลา 4-10 วัน มาสกัดไวรัสโดยอ้างอิงจากงานวิจัยของ Xie and Yang (2005) โดยทำการตัดส่วนที่เป็นก้านตารวมถึงตา (eye stock) และในส่วนของตับและตับอ่อน (hepatopancreas) ออก จากนั้นนำส่วนที่เหลือมาปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันในบัฟเฟอร์ TESP (ประกอบด้วย 50 mM Tris-HCl 5 mM EDTA 500 mM NaCl, pH 8.5) ที่มีสารยับยั้งการทำงานของ proteinase (PMSF) 1 mM โดยใช้อัตราส่วน น้ำหนักของ crayfish 1 g ต่อบัฟเฟอร์ TESP 10 ml

หลังจากเป็นเนื้อเยื่อ crayfish เป็นเนื้อเดียวกันได้ทำการปั่นเหวี่ยงที่ $3,500 \times g$ เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสมากรองด้วยผ้าขาวบาง (400 mesh) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูง $30,000 \times g$ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจะเห็นเยื่อสีชมพูติดอยู่กันหมด ให้ใช้ Dropper เป่าออกเบาๆ แล้วเก็บส่วนที่เป็นตะกอนสีขาว มาละลายในบัฟเฟอร์ TM (ประกอบด้วย 50 mM Tris-HCl 10 mM $MgCl_2$ pH 7.5) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว $3,000 \times g$ เป็นเวลา 5 นาที และนำส่วนใสมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูง $30,000 \times g$ เป็นเวลา 20 นาที ใช้ Dropper เป่าเยื่อสีชมพูออกและใช้บัฟเฟอร์ TM ละลายตะกอนขาว (ไวรัสตัวแดงดวงขาว) มาเก็บไว้ที่ $-80^\circ C$ ก่อนจะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป โดยไวรัสที่สกัดออกจาก crayfish จะนำมาตรวจสอบคุณภาพด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ Transmission electron microscopy และทำการวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยเทคนิค Bradford

2.1.6.3 แยกส่วนโครงสร้างของไวรัสตัวแดงดวงขาว

นำไวรัสที่สกัดออกจาก crayfish มาทำการแยกเป็นสองส่วนคือ Envelope และ Nucleocapsid เป็นเวลา 30 นาที ที่ $4^\circ C$ เก็บตะกอนมาละลายในบัฟเฟอร์ TMN (ประกอบด้วย 20 mM Tris- HCl 150 mM NaCl 2 mM $MgCl_2$, pH 7.5) ที่มี Triton-X 100 1 % และเขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว $20,000 \times g$ เป็นเวลา 30 นาที ที่ $4^\circ C$ เก็บส่วนใส (ส่วนของ Envelope) และนำส่วนตะกอนมาละลายในบัฟเฟอร์ TMN ที่มี Triton-X 100 1 % อีกครั้งหนึ่ง และเขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว $20,000 \times g$ เป็นเวลา 20 นาที ที่ $4^\circ C$ เก็บส่วนที่เป็นตะกอน (ส่วนของ Nucleocapsid) มาละลายด้วยบัฟเฟอร์ TMN ทำการตรวจสอบคุณภาพในการแยกส่วนโครงสร้างของไวรัสด้วยเทคนิค SDS-PAGE และวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยเทคนิค Bradford

2.1.6.4 ตรวจหาบริเวณที่มีโปรตีน WSV399 ด้วยเทคนิค Western blot และ Immunoelectron microscopy

การตรวจหาบริเวณที่มีโปรตีน WSV399 ในโครงสร้างของไวรัสด้วยเทคนิค Western blot เริ่มจากการนำไวรัสตัวแดงดวงขาวที่สกัดจาก crayfish และ ส่วนของไวรัสแต่ละส่วนที่ถูกแยกออกจากกัน คือ ส่วนของ Envelope และ Nucleocapsid ส่วนละ $15 \mu g$ มาวิเคราะห์ด้วย 12.5% SDS-PAGE เพื่อแยกโปรตีนตามขนาด จากนั้นทำการถ่ายโอน (Transfer) โปรตีนทั้งหมดลงในเมมเบรน Polyvinylidene difluoride (PVDF) ทำการ Blocking โดยการบ่มเมมเบรนกับ Skim milk 5% ในบัฟเฟอร์ $1 \times$ TBS-T (0.5% Tween 20 in TBS buffer) ที่ $4^\circ C$ ข้ามคืน ล้างเมมเบรนด้วยบัฟเฟอร์ $1 \times$ TBS-T 3 รอบ รอบละ 10 นาทีบนเครื่องเขย่า (See-saw rocker) จากนั้นบ่มเมมเบรนกับ purified polyclonal mouse anti-WSV399 antibody ที่ถูกทำให้เจือจาง 2,500 เท่า ใน 2.5% skim milk, $1 \times$ TBS-T ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วล้างเมมเบรนด้วยบัฟเฟอร์ $1 \times$ TBS-T 3 รอบ รอบละ 10 นาที นำเมมเบรนมาบ่มกับ horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) ที่ถูกทำให้เจือจาง 5,000 เท่า ใน 2.5% skim milk, $1 \times$ TBS-T ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเมมเบรนด้วยบัฟเฟอร์ $1 \times$ TBS-T 3 รอบ รอบละ 10 นาที และทำการตรวจหาโปรตีน WSV399 ด้วย สาร chemiluminescence (Western Lightning® Plus-ECL, (Perkin-Elmer, Inc.)) บนแผ่นฟิล์ม

ในส่วนของการตรวจหาบริเวณที่มีโปรตีน WSV399 ในโครงสร้างของไวรัสตัวแดงดวงขาว ด้วยเทคนิค Immunoelectron microscopy เริ่มจากนำสารละลายไวรัสที่สกัดได้จาก crayfish 10 μ l มาหยดลงบน carbon-coated nickel grids (150 mesh) ทิ้งไว้ 5 นาทีแล้วซับออก แล้วทำการ Blocking โดยการใส่บัพเฟอร์ Blocking (ประกอบด้วย 5% bovine serum albumin 5% normal serum 0.1% cold water skin gelatin 10 mM phosphate buffer 150 mM NaCl, pH 7.4) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นหยด purified polyclonal mouse anti-WSV399 antibody ที่ถูกทำให้เจือจาง 50 เท่า ในบัพเฟอร์ Incubation (ประกอบด้วย 0.1% Aurion Basic-c 15 mM NaN₃ 10 mM phosphate buffer 150 mM NaCl, pH 7.4) ลงบน Grid โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้าง Grid ด้วยบัพเฟอร์ Incubation 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จากนั้นหยด goat anti-mouse secondary antibody ที่ต่อด้วย 18-nm-diameter gold particles ที่ถูกทำให้เจือจาง 50 เท่า ในบัพเฟอร์ Incubation ลงบน Grid โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง Grid ด้วยบัพเฟอร์ Incubation 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ล้างด้วยน้ำ distilled water อีก 2 ครั้ง เพื่อกำจัดเกลือออก และทำการย้อมไวรัสด้วยเทคนิค Negative staining ด้วยสาร 1% phosphotungstic acid, pH 7.2 (PTA) เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำ Grid ไปวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค Transmission electron microscopy

2.1.7 ตรวจสอบความเกี่ยวข้องของยีน WSV399 กับการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ

จากผลการทดลองที่ผ่านมาพบว่าโปรตีน PmVRP15 สามารถจับกับโปรตีน WSV399 ของไวรัสตัวแดงดวงขาว ซึ่งเป็นโปรตีนโครงสร้างที่อยู่ในส่วนของ Tegument จึงอยากทราบความเกี่ยวข้องของ WSV399 ในการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้ง โดยทำการยับยั้งการแสดงออกของยีน WSV399 ในกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและตรวจสอบอัตราการตายของกุ้ง

2.1.7.1 สร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับยีน WSV399 (WSV399 dsRNA)

ทำการเพิ่มจำนวนยีน WSV399 โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะ 2 คู่คือ WSV399-T7-F/WSV399-R และ WSV399-F/ WSV399-T7-R (ตารางที่ 2.4) ทำให้ยีน WSV399 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ T7 promoter อยู่ที่ปลาย 5' และ 3' ตามลำดับ ใน PCR reaction ประกอบด้วย 10x Reaction buffer 5 μ l dNTP mix ความเข้มข้น 10 mM 0.5 μ l DNA แม่แบบ (pBAD-WSV399) ความเข้มข้น 50 ng/ μ l 1 μ l ใช้ คู่ primer (WSV399-T7-F/WSV399-R และ WSV399-F/ WSV399-T7-R) ความเข้มข้น 10 μ M อย่างละ 0.5 μ l และ Taq polymerase (RBC Bioscience) 0.25 μ l โดยจะใช้ PCR condition ดังนี้ Pre-denature 94 °C 2 นาที จากนั้นเข้าสู่ PCR cycle Denature step 94 °C 15 วินาที, Annealing step 60 °C 30 วินาที, Extension step 72 °C 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และ Final extension 72 °C 5 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลด้วย 1.2% Agarose gel electrophoresis โดยจะตัดเจลเฉพาะบริเวณที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ออกมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Gel/ PCR DNA purification kit (Favorgen) จากนั้นนำไปวัดความเข้มข้นด้วย spectrophotometer นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์ 1 μ g มาสร้างเป็นอาร์เอ็นเอสายคู่ด้วย T7 RiboMAX™ Express RNAi System (Promega) จากนั้นนำไปตรวจสอบผลด้วย 1.2% Agarose gel electrophoresis และวัดความเข้มข้นด้วย spectrophotometer เก็บที่ -20 °C ก่อนนำไปทำการทดลองต่อไป โดยในการทดลองนี้ได้ใช้อาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับยีน GFP

(GFP dsRNA) เป็นตัวควบคุม ขั้นตอนการสร้างใช้คู่มือ GFP-T7-F/GFP-R และ GFP-F/ GFP-T7-R (ตารางที่ 2.4) และทำตามขั้นตอนที่กล่าวมาด้านบน

2.1.7.2 ตรวจสอบการแสดงออกของยีนไวรัสหลังจากยับยั้งการแสดงออกของยีน WSV399 ของไวรัสตัวแดงดวงขาว

ในการทดลองนี้ใช้กึ่งกลาดำปลอดเชื้อขนาด 3-5 กรัม โดยจะแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่มดังนี้ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมคือ กึ่งที่ฉีดด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่ของยีน GFP (GFP dsRNA) 10 µg/g กึ่ง กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มทดลองคือ กึ่งที่ฉีดด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่ของยีน WSV399 (WSV399 dsRNA) 10 µg/g กึ่ง โดยกึ่งทั้งสองกลุ่มถูกฉีดด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่ที่บ่มกับไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เจือจาง 10^{-7} เท่า (เป็น dose ที่กึ่งตาย 100 % ภายใน 3 วันหลังจากติดเชื้อ) หลังจากกึ่งติดเชื้อ 24 ชั่วโมง ทำการเก็บเลือดกึ่งของทั้งสองกลุ่ม นำมาสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดด้วย GENEzol (Geneaid) จากนั้นนำไปสร้าง First-strand cDNA ด้วย RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) ทำการวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีน VP28 ซึ่งเป็นยีนโครงสร้างส่วน envelope ของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่มีการแสดงออกในระยะ late ในกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ซึ่งนำมาใช้เป็นยีน marker ในการตรวจสอบความสามารถในการเพิ่มจำนวนของไวรัสในกึ่งที่ติดเชื้อ โดยจะทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนดังกล่าวด้วยเทคนิค RT-PCR ใน PCR reaction ประกอบด้วย 10x Reaction buffer 5 µl dNTP mix ความเข้มข้น 10 mM 0.5 µl cDNA เจือจาง 5 เท่า 1 µl ใช้ คู่ primer VP28-F/VP28R (ตารางที่ 2.4) ความเข้มข้น 10 µM อย่างละ 0.5 µl และ Taq polymerase (RBC Bioscience) 0.25 µl โดยจะใช้ PCR condition ดังนี้ Pre-denature 94 °C 2 นาที จากนั้นเข้าสู่ PCR cycle Denature step 94 °C 15 วินาที, Annealing step 60 °C 30 วินาที, Extension step 72 °C 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และ Final extension 72 °C 5 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลด้วย 1.2% Agarose gel electrophoresis โดยทำการตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีน WSV399 โดยการตรวจสอบการแสดงออกของยีน WSV399 ด้วยคู่มือ WSV399_RT_F/WSV399_RT_R (ตารางที่ 2.4) และใช้ยีน EF-1α เป็น internal control ใช้คู่มือ EF-1α -F/ EF-1α R (ตารางที่ 2.4) ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนตามขั้นตอนด้านบน

2.1.7.3 ตรวจสอบอัตราการตายของกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวหลังจากยับยั้งการแสดงออกของยีน WSV399 ของไวรัสตัวแดงดวงขาว

ในการทดลองนี้ใช้กึ่งกลาดำปลอดเชื้อขนาด 3-5 กรัม โดยจะแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่มดังนี้ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมคือ กึ่งที่ฉีดด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่ของยีน GFP (GFP dsRNA) 10 µg/g กึ่ง กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มทดลองคือ กึ่งที่ฉีดด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่ของยีน WSV399 (WSV399 dsRNA) 10 µg/g กึ่ง ใช้กึ่ง 10 ตัวต่อกลุ่มทดลอง และทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ โดยกึ่งทั้งสองกลุ่มถูกฉีดด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่ที่บ่มกับไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เจือจาง 10^{-7} เท่า (เป็น dose ที่กึ่งตาย 100 % ภายใน 3 วันหลังจากติดเชื้อ) จากนั้นตรวจสอบอัตราการตายทุกๆ 6 ชั่วโมงหลังกึ่งติดเชื้อและนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ต่อไป

ตารางที่ 2.4 คู่ไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีนไวรัสหลังจากยับยั้งการแสดงออกของยีน WSV399 ของไวรัสตัวแดงดวงขาว

Primer	Sequence (5' to 3')
WSV399_F	TTCCACATCGCATTTCGCA
WSV399_R	CACGGGGATCAATATCTTGA
WSV399_T7_F	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGTTCCACATCGCATTTCGCA
WSV399_T7_R	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCACGGGGATCAATATCTTGA
GFP_F	ATGGTGAGCAAGGGGGAGGA
GFP_R	TTACTTGTACAGCTCGTCCA
GFP_T7_F	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGATGGTGAGCAAGGGGGAGGA
GFP_T7_R	GGATCCTAATACGACTCACTATAGTTACTTGTACAGCTCGTCCA
VP28_F	TCACTCTTTCGGTCGTGTCCG
VP28_R	CCACACACAAAGGTGCCAAC
WSV399_RT_F	CGCCTCGAGGTTCCAGAAATGGTTTGAATCGTT
WSV399_RT_R	GCCGAATTCGCTTTGTTTGATAATACAATTTTCACCTTGT
EF-1 α _F	GGTGCTGGACAAGCTGAAGGC
EF-1 α _R	CGTTCCGGTGATCATGTTCTTGATG

2.2 ศึกษาการจัดเรียงตัวของยีนและบริเวณควบคุมของยีน *PmVRP15* ในจีโนมของกุ่มกุลาดำ

2.2.1. เตรียมรีคอมบิเนนท์พลาสมิดที่มีโปรโมเตอร์ *PmVRP15*

จากผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ 5' flanking promoter ด้วยเทคนิค genome walking พบว่ามีขนาดประมาณ 2 กิโลคู่เบส เนื่องจากต้องการศึกษาการควบคุมการแสดงออกของยีน *PmVRP15* จึงทำการตรวจหาบริเวณจำเพาะที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน จึงทำการตัดส่วนของ 5' flanking promoter ให้มีขนาดเล็กลง โดยกำหนดให้ปลายด้าน 3' บริเวณหน้า start codon (narrow down promoter) และตรวจสอบความสามารถในการทำงานของโปรโมเตอร์ ในการทดลองนี้เริ่มจากการเลือกช่วงบน 5' flanking promoter โดยช่วงที่เลือกมาทำการทดลองคือ บริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -2047 ถึง +612 -1621 ถึง +612 -1147 ถึง +612 -907 ถึง +612 -727 ถึง +612 -525 ถึง +612 -427 ถึง +612 -387 ถึง +612 -287 ถึง +612 -208 ถึง +612 -92 ถึง +612 และ -34 ถึง +612 จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของโปรโมเตอร์นั้นๆด้วยเทคนิค PCR ใช้ Genomic DNA ของกุ่มกุลาดำ เป็นแม่แบบ ใช้คู่ไพรเมอร์จำเพาะต่อบริเวณ 5' flanking promoter นั้นๆ (ตารางที่ 2.5) และใช้เอนไซม์ KOD Taq polymerase (TOYOBO) โดยจะใช้ PCR condition ดังนี้ Pre-denature 94 °C 2 นาที จากนั้นเข้าสู่ PCR cycle Denature step 94 °C 30 วินาที, Annealing step 55 °C 30 วินาที, Extension step 68 °C 30 วินาที จำนวน 30 รอบ และ Final extension 72 °C 5 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลด้วย 1.0% Agarose gel electrophoresis นำผลิตภัณฑ์ PCR มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Gel/PCR DNA fragments extraction kit (Geneaid) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR และเวกเตอร์ pGL3 (Promega) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* และ *XhoI* จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย

Gel/PCR DNA fragments extraction kit (Geneaid) และ เชื่อมเวกเตอร์ pGL3 กับ 5' flanking promoter แต่ละชิ้น เข้าด้วยกันโดยใช้เอนไซม์ Ligation High Ver. 2 (TOYOBO) บ่มที่ 16 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำเข้าสู่ *E. coli* DH5 α (RBC Bioscience) ด้วยวิธี CaCl₂-transformation และทำการตรวจหา positive colonies บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB agar) ที่มียาแอมพลิซิลิน 100 μ g/ μ l (LB-amp) นำโคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ไปตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 5' flanking promoter ด้วยเทคนิค DNA sequencing

2.2.2 ตรวจสอบความสามารถในการทำงานของโปรโมเตอร์ (Promoter activity assay) ด้วย Dual luciferase reporter assay

หลังจากได้พลาสมิดรีคอมบิแนนท์ที่มี 5' flanking promoter ของยีน *PmVRP15* แล้ว จึงนำไปทำการตรวจสอบความสามารถในการทำงานของโปรโมเตอร์ โดยพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ที่นำมาทำการทดลองมีดังนี้ p(-2047/+612) p(-1621/+612) p(-1147/+612) p(-907/+612) p(-727/+612) p(-525/+612) p(-427/+612) p(-387/+612) p(-287/+612) p(-208/+612) p(-92/+612) และ p(-34/+612) นำพลาสมิดที่ต้องใช้ในการทดลอง มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Qiagen plasmid mini kit (Qiagen) จากนั้นทำการตรวจวัดความเข้มข้นของพลาสมิดที่ A₂₆₀ ด้วยเครื่อง UV-spectrophotometer จากนั้นนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แมลง S2 (*Drosophila* Schneider 2 (S2) cell) เริ่มจากการนำเซลล์ S2 มาเลี้ยงใน 24-well plate โดยทำการทำให้มีปริมาณเซลล์ 8×10^5 เซลล์ต่อ 1 well ในอาหาร complete Schneider's *Drosophila* Medium ที่มีส่วนประกอบของ heat-inactivated FBS 10% และยาปฏิชีวนะ (penicillin G 50 units และ streptomycin sulfate 50 μ g ต่อ 1 ml ของอาหารเลี้ยงเชื้อ, Invitrogen) จากนั้นเตรียมพลาสมิดสำหรับการตรวจวัดความสามารถในการทำงานของโปรโมเตอร์ (p(-2047/+612) p(-1621/+612) p(-1147/+612) p(-907/+612) p(-727/+612) p(-525/+612) p(-427/+612) p(-387/+612) p(-287/+612) p(-208/+612) p(-92/+612) และ p(-34/+612)) และ พลาสมิดที่ช่วยตรวจวัดความสามารถในการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ S2 คือ phRL/AcMNPV*ie1* โดยใช้ Effectene transfection reagent (Qiagen) เพื่อนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ S2 หลังจาก 60 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์ และทำการตรวจสอบความสามารถในการทำงานของโปรโมเตอร์ด้วย Dual-Luciferase[®] Reporter Assay (Promega) โดยจะทำการตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีน Firefly Luciferase ของพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ pGL3 ที่มีส่วนของโปรโมเตอร์ ต่ออยู่ด้วยยีน Firefly Luciferase และทำการตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีน Renilla Luciferase ของพลาสมิดควบคุม phRL-AcMNPV *ie-1* ที่มีโปรโมเตอร์ AcMNPV *ie-1* ต่ออยู่ด้วยยีน Renilla Luciferase โดยจะนำค่าที่ได้มา Normallize กับค่า Firefly Luciferase ในแต่ละตัวอย่าง เพื่อนำมาคำนวณค่าความสามารถในการทำงานของโปรโมเตอร์ต่อไป

ตารางที่ 2.5 แสดงคู่ไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มจำนวน 5' flanking promoter ของยีน *PmVRP15*

Primer name	Sequence (5'→3')
promo-2047SacIF	CGCGGAGCTC-CCTAGATGGAAGAAGAAAAAATACTTTTGA
promo-1621SacIF	ACAGAGCTC-CCACTCAGGCCAGATGTGGTATACAGTT
promo-1147SacIF	AGCGAGCTC-TGGGAGCTGCTCTTATCCAATGTGATGC
promo-907SacIF	AGCAGGAGCTC-TGAGTCCGATGCTCTAACACTCG
promo-727SacIF	AGCAGGAGCTC-GCTGAACCTGTGTTTTCTGCTTGT
promo-427SacIF	AGCAGGAGCTC-TCACTCCTGCTCGGTTTTCC
promo-525SacIF	TATGAGCTC-CCGTAGTGAACAGCTCCGGGTCTT
promo-387SacIF	AGCAGGAGCTC-GTCGAGAGATTTTTTGTGGGCATCA
promo-208SacIF	AGCAGGAGCTC-ACCTATGCGCTGATAATGGCTT
promo-287SacIF	AGCAGGAGCTC-TGAAGTATTTATATTTGTATTTGTAAACATTAATGA
promo-92SacIF	GGCGAGCTC-CTTCAGGTTCAAGTGCAAAACGTCATCC
promo-34SacIF	AGCAGGAGCTC-CTCAGTAATATAAAGCACAGTTCCCACG
promo+612XhoIR	GCAGTCTCGAG-TGCGTAGCTAATGGGATGAGGA

2.2.3 ยีนยับยั้งบริเวณด้านปลาย 5' ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน *PmVRP15* ด้วยเทคนิค Deletion mutagenesis

จากผลการหาช่วงบน 5' flanking promoter ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน *PmVRP15* พบว่าบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -525 ถึง -428 และ -287 ถึง -209 น่าจะมีบริเวณที่จับสำหรับ ตัวกดการแสดงออก (Repressor) และ ตัวกระตุ้นการแสดงออก (Activator) ตามลำดับ เพื่อยืนยันว่าทั้งสองช่วงมีผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน *PmVRP15* จึงทำการตัดนิวคลีโอไทด์ทั้งสองช่วงนั้นออก (Promoter deletion assay) และตรวจสอบความสามารถในการทำงานของโปรโมเตอร์ (Promoter activity assay) ที่เปลี่ยนแปลงไป สำหรับการตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -525 ถึง -428 จะใช้ p(-727/+612) เป็นแม่แบบ และสำหรับการตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -287 ถึง -209 จะใช้ p(-387/+612) เป็นแม่แบบ ด้วยเทคนิค Rolling PCR โดยจะใช้คู่ไพรเมอร์ p(-727/+612) del(-525/-428)F/R ในการสร้างพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ p(-727/+612) del(-525/-428) และคู่ไพรเมอร์ p(-387/+612) del(-287/-209)F/R ในการสร้างพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ p(-387/+612) del(-287/-209) (ตารางที่ 2.6) และใช้เอนไซม์ KOD Taq polymerase (TOYOBO) โดยจะใช้ PCR condition ดังนี้ Pre-denature 94 °C 2 นาที จากนั้นเข้าสู่ PCR cycle Denature step 94 °C 30 วินาที, Annealing step 55 °C 30 วินาที, Extension step 68 °C 7 นาที จำนวน 30 รอบ และ Final extension 72 °C 30 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลด้วย 1.0% Agarose gel electrophoresis นำผลิตภัณฑ์ PCR มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Gel/PCR DNA fragments extraction kit (Geneaid) เชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์ให้เป็นวง โดยใช้เอนไซม์ Ligation High Ver. 2 (TOYOBO) บ่มที่ 16 °C เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นนำเข้าสู่ *E. coli* DH5 α (RBC Bioscience) ด้วยวิธี CaCl₂-transformation และทำการตรวจหา positive

colony บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB agar ที่มียาแอมพลิซิลิน 100 µg/µl (LB-amp) นำ Positive clone ไปตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค DNA sequencing

จากนั้นนำไปตรวจสอบความสามารถในการทำงานของโปรโมเตอร์ด้วย Dual-Luciferase® Reporter Assay (Promega) โดยจะทำการเปรียบเทียบความสามารถในการทำงานของโปรโมเตอร์ p(-727/+612) ซึ่งเป็น Wild type เทียบกับ p(-727/+612) del(-525/-428) ซึ่งเป็น Mutant และ p(-387/+612) ซึ่งเป็น Wild type เทียบกับ p(-387/+612) del(-287/-209) ซึ่งเป็น Mutant และนำไปวิเคราะห์ผลการทดลองต่อไป

ตารางที่ 2.6 แสดงคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการยืนยันบริเวณที่ควบคุมการแสดงออกของยีน *PmVRP15*

Primer name	Sequence (5'→3')
p(-727/+612) del(-525/-428)F	TCACTCCTGCTCGGTTTTCCCGCC
p(-727/+612) del(-525/-428)R	GTGAGCCCACCCTGACCCCAGGT
p(-387/+612) del(-287/-209)F	ACCTATGCGCTGATAATGGCTTT
p(-387/+612) del(-287/-209)R	AAAAGTATGTAAAATTAGATACTAACGCTTCTTATC

2.2.4 ตรวจสอบบริเวณจำเพาะของ **transcription factor** ที่สามารถจับบริเวณด้านปลาย 5' ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน *PmVRP15* ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -525 ถึง -428 และ -287 ถึง -209 มีบริเวณที่จับสำหรับ ตัวกดการแสดงออก (Repressor) และ ตัวกระตุ้นการแสดงออก (Activator) ที่พบว่าเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน *PmVRP15* มาตรวจสอบบริเวณที่จำเพาะกับ Transcription factor โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการทำนาย ดังนี้ TF search Ver.1.3 Match 1.0 (TRANSFAC® Public database) และ Alibaba (TRANSFAC® Public database) จากนั้นนำไปตรวจสอบกับ JASPAR database อีกรอบ เพื่อยืนยันบริเวณจับของ Transcription factor เพื่อนำไปทำการทดลองต่อไป

2.2.5 ตรวจสอบบริเวณจำเพาะของ **transcription factor** ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน *PmVRP15* ด้วยเทคนิค Site-directed mutagenesis

หลังจากทำการทำนายตำแหน่งที่คาดว่าจะมี Transcription factor มาจับ และควบคุมการแสดงออกของยีน พบว่าส่วนของโปรโมเตอร์ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -525 ถึง -429 มีบริเวณจับของ Transcription factor ดังนี้ CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) ที่ตำแหน่ง -460 ถึง -452 Spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene spi1 (PU.1) ที่ตำแหน่ง -493 ถึง -484 Myb proto-oncogene protein (Myb) ที่ตำแหน่ง -517 ถึง -511 proto-oncogene c-Rel transcription factor (Rel) ที่ตำแหน่ง -508 ถึง -499 Interferon Regulatory factor (IRF) ที่ตำแหน่ง -485 ถึง -481 และ Nuclear transcription factor Y subunit beta (NFYB) ที่ตำแหน่ง -480 ถึง -475 ในส่วนของบริเวณโปรโมเตอร์ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -287 ถึง -209 มีบริเวณจับของ Transcription factor ดังนี้ Octamer transcription factor binding site 1 (Oct-1) ที่ตำแหน่ง -275 ถึง -268 CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) ที่ตำแหน่ง -268 ถึง -260 Nuclear factor of activated T-cells transcription factor (NFAT) ที่ตำแหน่ง -229 ถึง -224 และ Ultrabithorax (Ubx) ที่ตำแหน่ง -257 ถึง -252 จากนั้นทำการเปลี่ยนลำดับเบส (Site-directed

mutagenesis) ตรงตำแหน่งที่จำเพาะกับ transcription factor ด้วยเทคนิค Rolling PCR โดยจะใช้คู่ไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบให้มีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงบริเวณที่จำเพาะกับ transcription factor นั้นๆ (ตารางที่ 2.7) และใช้เอนไซม์ KOD Taq polymerase (TOYOBO) โดยจะใช้ PCR condition ดังนี้ Pre-denature 94 °C 2 นาที จากนั้นเข้าสู่ PCR cycle Denature step 94 °C 30 วินาที, Annealing step 55 °C 30 วินาที, Extension step 68 °C 7 นาที จำนวน 30 รอบ และ Final extension 72 °C 30 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลด้วย 1.0% Agarose gel electrophoresis นำผลิตภัณฑ์ PCR มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Gel/PCR DNA fragments extraction kit (Geneaid) เชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์ให้เป็นวง โดยใช้เอนไซม์ Ligation High Ver. 2 (TOYOBO) บ่มที่ 16 °C เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นนำเข้าสู่ *E. coli* DH5 α (RBC Bioscience) ด้วยวิธี CaCl₂-transformation และทำการตรวจหา positive clone บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB agar ที่มียาแอมพลิซิลิน 100 μ g/ μ l (LB-amp) นำ Positive clone ไปตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค DNA sequencing จากนั้นนำไปตรวจสอบความสามารถในการทำงานของโปรโมเตอร์ด้วย Dual-Luciferase[®] Reporter Assay (Promega) และนำมาวิเคราะห์ผลการทดลองต่อไป

ตารางที่ 2.7 แสดงคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหาบริเวณจำเพาะของ transcription factor ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน *PmVRP15* ด้วยเทคนิค Site-directed mutagenesis

Primer name	Sequence (5'→3')
p(-525/+612)muC/EBP_F	CTTAAACCGTACGGGTCTGA
p(-525/+612)muC/EBP_R	CCATTGATAGAGCGCGATCT
p(-525/+612)muPU.1_F	ACCATGAAACCGATAGATCGC
p(-525/+612)muPU.1_R	GAATTGTAGTGAAAGACCCGGA
p(-525/+612)muMyb_F	ATTTCCGGGTCTTTCACTACAAAAGAGGATG
p(-525/+612)muMyb_R	GCGCACTACGGGAGCTCGGTA
p(-525/+612)muRel_F	TGGCACTACAAAAGAGGATGAAACC
p(-525/+612)muRel_R	GATTCGGAGCTGTTCACTACGGG
p(-525/+612)muIRF_F	CAATAGATCGCGCTCTATCTTTGGC
p(-525/+612)muIRF_R	GCGTCATCCTCTTTTGTAGTGAAAGA
p(-525/+612)muNFYB_F	GCAAGATCGCGCTCTATCTTTGG
p(-525/+612)muNFYB_R	GATTTATCCTCTTTTGTAGTGAAAGACCC
p(-287/+612)muOct-1_F	ATCGTTTGTAACATTAATGATAATGTCA
p(-287/+612)muOct-1_R	TACGATAAATACTTCAGAGCTCGG
p(-287/+612)muC/EBP_F	ATGGCATTAAATGATAATGTCATATAATCTT
p(-287/+612)muC/EBP_R	AAGGTACAAATATAAATACTTCAGAGCTCG
p(-287/+612)muNFAT_F	GGAAAGAAATGAGAATAAACCTATGC
p(-287/+612)muNFAT_R	TAATTCTAAAGATTATATGACATTATCATTAATG
p(-287/+612)muUbx_F	CAATAATGTCATATAATCTTTAGAAGGAAAAAAG
p(-287/+612)muUbx_R	TCGATGTTACAAAATACAAATATAAATACTTCA

2.3 ระบุชนิดของ miRNAs และ mRNA เป้าหมายจากกึ่งกลาดำที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

2.3.1 ระบุชนิดของ miRNAs จากกึ่งกลาดำที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

2.3.1.1 เตรียม RNA ขนาดเล็กจากเซลล์เม็ดเลือดในกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

เลี้ยงกึ่งกลาดำขนาด 15-20 กรัม ที่ความเค็ม 15 ppt ฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเข้าบริเวณกล้ามเนื้อของกึ่งกลาดำ ในปริมาณที่ทำให้กึ่งตาย 100% ภายในเวลา 3 วัน และเก็บเลือดที่ 0 6 และ 48 ชั่วโมงหลังจากการติดเชื้อ เก็บตัวอย่างจากกึ่งกลาดำเวลาละ 20 ตัว โดยใช้สารละลายต้านการแข็งตัวของเลือด 10% sodium citrate ปั่นเก็บเซลล์เม็ดเลือดโดยนำมาเซนทริฟิวจ์ที่ 800 x g เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

สกัด RNA ขนาดเล็กทั้งหมด โดยใช้ mirVana™ miRNA Isolation Kit (Ambion) นำเซลล์เม็ดเลือดกึ่งที่เวลา 0 6 และ 48 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ มาเติม Lysis/Binding buffer และนำไป homogenize จากนั้นเติม miRNA Homogenate Additive แชนในน้ำแข็ง 10 นาที สกัด RNA โดยใช้ Acid Phenol:Chloroform นำสารละลายใส่ส่วนบนซึ่งมี RNA ถ่ายลงหลอดใหม่ และเติม absolute ethanol ในอัตราส่วน 1.25 เท่าของปริมาตรตั้งต้น จากนั้นนำสารละลายมาผ่าน Glass-fiber filter ให้ RNA ขนาดเล็กทั้งหมดจับอยู่บน filter แล้วล้าง filter ด้วย Washing Solution และใช้ Nuclease-free water ชะ RNA ออกจาก filter เก็บ RNA ที่ -80 องศาเซลเซียส

2.3.1.2 สร้างห้องสมุด miRNA และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ miRNA

นำ RNA ขนาดเล็กทั้งหมดมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค Next Generation Sequencing (Illumina) โดยนำ RNA ขนาดเล็กทั้งหมด ปริมาณ 1 ไมโครกรัม มาต่อด้วย adapter ที่จำเพาะต่อปลาย 3'OH ของ miRNA และต่อ adapter ที่ปลาย 5' phosphate ด้วยเอนไซม์ T4 RNA ligase จากนั้นใช้เอนไซม์ SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) สร้าง First strand cDNA เพิ่มจำนวน DNA ด้วยเทคนิค PCR และทำบริสุทธิ์ PCR product โดยนำมาแยกตามขนาดผ่าน 6% Novex TBE PAGE gel (Invitrogen) และเลือก PCR product ขนาด 145 - 160 นิวคลีโอไทด์ มาสกัดโดยใช้ Nuclease-free water เก็บ Small RNA library ไว้ -80 องศาเซลเซียส ตรวจสอบคุณภาพของ Small RNA library ด้วยเทคนิค real time PCR โดยใช้ KAPA library quantification kit (KAPA Biosystems) และตรวจสอบขนาดของ Small RNA library ด้วย High sense DNA kit (Agilent) จากนั้นนำ Small RNA library มาเจือจางจนได้ความเข้มข้น 2 nM และ denature ด้วย 0.2 M NaOH เพื่อทำให้ DNA เป็นสายเดี่ยว นำ denature small RNA library มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง MiSeq (Illumina)

2.3.1.3 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และระบุชนิดของ miRNA

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ Next Generation Sequencing มาวิเคราะห์หาชนิดของ miRNA โดยใช้ MiSeq Reporter software (Illumina) และ CLC Genomics Workbench software (CLC Bio) เริ่มจากการตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 3' และ 5' adapter ออกจากนั้นเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีคุณภาพต่ำออก คัดเลือกสายนิวคลีโอไทด์ที่มีขนาด 18 - 24 นิวคลีโอไทด์เท่านั้นมาวิเคราะห์ต่อ โดยนำข้อมูลลำดับ

นิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ผ่านทาง National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยโปรแกรม BLASTN เพื่อการจัดข้อมูล rRNA tRNA หรือ mRNA ที่เสียหายทำให้เกิดสาย RNA มีขนาดเล็ก นำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล miRBase 19.0 (<http://www.mirbase.org>) เพื่อหา miRNA จากงูหลาดดำที่เหมือนกับ miRNA ที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้

2.3.2 วิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ miRNA ในงูหลาดดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

วิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ miRNA ในเซลล์เม็ดเลือดของงูหลาดดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยเก็บเซลล์เม็ดเลือดจากงูหลาดดำที่เวลา 0 6 และ 48 ชั่วโมงหลังจากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว เวลาละ 3 ตัว และนำมาสกัด total RNA โดยใช้ mirVanaTM miRNA Isolation kit (Ambion) และวัดความเข้มข้นด้วย NanoDrop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific) ออกแบบไพรเมอร์สำหรับการทำ Stem-loop PCR primer (ตารางที่ 2.8) Kramer (2011) สร้าง first strand cDNA โดยใช้ pooled total RNA จากตัวอย่างงู 3 ตัว ตัวละเท่ากัน ปริมาณ 1.5 µg เป็นแม่แบบ และใช้ไพรเมอร์ Stem-loop RT primer ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะต่อ miRNA แต่ละชนิด และทำปฏิกิริยา reverse transcription โดยใช้เอนไซม์ SuperScript III RT จากนั้นนำ cDNA ที่จำเพาะต่อ miRNA แต่ละชนิดมาทำ real-time PCR โดยใช้ CFX96 Touch Real-time PCR Detection System (Bio-Rad) ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad) Universal reverse primer และ Forward primer (ตารางที่ 2.8) ที่จำเพาะต่อ miRNA แต่ละชนิดทำปฏิกิริยาที่ 98°C เป็นเวลา 2 นาที และ 95°C เป็นเวลา 5 วินาที และ 62°C เป็นเวลา 30 วินาที ทั้งหมด 40 รอบ โดยทำ Melt curve analysis เพื่อตรวจสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา PCR โดยใช้ U6 เป็น internal control

2.3.3 ทำนายยีนเป้าหมายของ miRNA ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันจากงูหลาดดำด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

ทำนายยีนเป้าหมายของ miRNA ที่ได้จากการทำ Next Generation Sequencing อาศัยโปรแกรม miRNA Target Identification-V0.5 พัฒนาโดย ดร.กุลวดี สมบูรณ์วิวัฒน์ สาขาวิชาวิศวกรรมซอฟต์แวร์ (หลักสูตรนานาชาติ) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง บริเวณปลาย 5' ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 2-8 ของ miRNA จะสามารถจับกับบริเวณของยีนเป้าหมายอย่างจำเพาะ เนื่องจากงูหลาดดำยังไม่มีฐานข้อมูลจีโนม ดังนั้นในงานวิจัยนี้ใช้ EST database ของงูหลาดดำเป็นฐานข้อมูลในการทำนายเป้าหมายของ miRNA นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเป้าหมายมาระบุชนิดโดยสืบค้นกับฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม BLASTX คัดเลือกยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันพร้อมกับระบุตำแหน่งของ miRNA บนยีนเป้าหมาย ได้แก่ บริเวณ 5'UTR 3'UTR และ ORF จากนั้นทำนายโครงสร้างการจับกันของ miRNA กับยีนเป้าหมายด้วยโปรแกรม RNAhybrid โดยมีค่า minimum free energy น้อยกว่าหรือเท่ากับ -20 kcal/mol

ตารางที่ 2.8 ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการทำ stem-loop realtime RT-PCR ของ miRNA ที่พบในกิ้งกูดดำ

Primer name	Sequence (5'-3')
Universal reverse primer	CCAGTGCAGGGTCCGAGGTA
pmo-miR-1-3p_RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCCATAC
pmo-miR-1-3p_Foward primer	GCGCCGCTGGAATGTAAAGAAG
pmo-miR-2a-3p_RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTCATCA
pmo-miR-2a-3p_Foward primer	CGGACGTATCACAGCCAGCTTTG
pmo-miR-7-5p_RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACACTACC
pmo-miR-7-5p_Foward primer	GCGGGGTGAAAGACATGGGTAG
pmo-miR-9a-3p_RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACACAGCT
pmo-miR-9a-3p_Foward primer	GCGGGGTCTTTGGTGATCTAGCT
pmo-miR-71-5p_RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACACTACC
pmo-miR-71-5p_Foward primer	GCGGGGTGAAAGAGATGGGTGG
pmo-miR-99a-3p_RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACGTGGGT
pmo-miR-99a-3p_Foward primer	GCCCTGCAAGCTCGATTCTATGG
pmo-miR-100-5p_RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCAAGTT
pmo-miR-100-5p_Foward primer	GCCACGAACCCGTAGATCCG
pmo-miR-184-3p_RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACACCCTT
pmo-miR-184-3p_Foward primer	CCAGCATGGACGGAGAAGTGA
pmo-miR-190_RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACACCAAG
pmo-miR-190_Foward primer	GGCGGGCGCAGATATGTTTGATATTC
pmo-miR-275-3p_RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACGCTACA
pmo-miR-275-3p_Foward primer	CGGGGGTCAGGTACCTGATGTAG
pmo-miR-305-5p_RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACGCACCT
pmo-miR-305-5p_Foward primer	GCGCCGATTGTACTTCATCAGGT
pmo-miR-315_RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCTTCTG
pmo-miR-315_Foward primer	CGGGCGTTTTGATTGTTGCTCAG
pmo-miR-317-3p_RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACGGGATA
pmo-miR-317-3p_Foward primer	GCACTCTGAACACAGCTGGTGG
pmo-miR-750_RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACGCTGGA
pmo-miR-750_Foward primer	CGCCTGCCAGATCTAACTCTTCC
pmo-miR-965_RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACGGGGAA
pmo-miR-965_Foward primer	CGGGCGTAAGCGTATGGCTTTTC
pmo-bantam_RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCAGCTT
pmo-bantam_Foward primer	GCCGCGTGAGATCATTGTGAAAG
U6_Foward primer	CTCGCTTCGGCAGCACCA
U6_Reverse primer	AACGCTTCACGAATTTGCGT

2.3.4 ตรวจสอบการจับกันของ miRNA กับ mRNA เป้าหมายโดยใช้เทคนิค Luciferase activity assay

จากการทำนาย mRNA เป้าหมายของ pmo-bantam คือ Kunitz-type protease inhibitor (KuSPI) และ beclin-1 associated autophagy key regulator (ATG14) ตามลำดับ จึงวิเคราะห์ความสามารถในการจับกันของ miRNA กับ mRNA เป้าหมายโดยใช้เทคนิค Luciferase activity assay เตรียมพลาสมิด luciferase reporter ที่มีส่วนของ mRNA เป้าหมายบริเวณ binding site ของ miRNA โดยเพิ่มจำนวนขึ้นยีนเป้าหมาย KuSPI และ ATG14 จาก cDNA ของเซลล์เม็ดเลือดกิ้งกูดดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยไพร์เมอร์ตารางที่ 2.9 จากนั้นโคลนขึ้นยีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เข้าสู่เวกเตอร์ pmirGLO (Promaga) จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ HEK293-T ใน 24-well plate บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO₂ เป็นเวลา 1 วัน แล้ว co-transfect 20 pmol ของ pmo-bantam mimic (TGAGATCATTGTGAAAGCTG) pmo-miR-750 mimic (CCAGATCTAACTCTTC

CAGCTC) หรือ miRNA scramble (GTCTCACGTACTAATATCAC) ร่วมกับ 200 ng ของ pmirGLO-KuSPI หรือ pmirGLO-ATG14 โดย Effectene transfection reagent (QIAGEN) เข้าสู่เซลล์ HEK293-T บ่มต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วเก็บเซลล์มาวัด luciferase activity โดยใช้ Dual-Luciferase® Reporter (DLR™) Assay System (Promega) วัดแสงที่เกิดขึ้นด้วย SpectraMax M5 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices)

ตารางที่ 2.9 ไพร์เมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายบริเวณ binding site ของ pmo-bantam และ pmo-miR-750

Primer	Sequence (5'-3')
Kunitz_F_SacI	GAGAGCTCAGATCCGGAATGCAC
Kunitz_R_XbaI	CGTCTAGAAAGTACAACATTTACTCAAATGATA
BEC_SAC1_F	ATGCAGAGCTCCTAGCTATTAGCGAGGCTCAG
beclin_xho1_R	ATGCACTCGAGGCTGTTCACCCAGCTCATTT

2.3.5 วิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ miRNA ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกิ้งกูดดำ

ฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาวเข้าสู่กล้ามเนื้อของกิ้งกูดดำขนาด 15-20 กรัม จากนั้นเก็บเนื้อเยื่อหลังฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นเวลาต่าง ๆ ที่ 0 6 24 และ 48 ชั่วโมง ซึ่งแต่ละเวลาแบ่งกึ่งเป็น 3 ชุด ชุดละ 3 ตัว โดยเนื้อเยื่อที่เก็บ ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือด (hemocyte) เหงือก (gill) อวัยวะน้ำเหลือง (lymphoid organ) และกระเพาะอาหาร (stomach) จากนั้นสกัด RNA ทั้งหมดโดยใช้ mirVana™ miRNA Isolation Kit (Ambion) ตามด้วยการสร้าง cDNA ด้วยไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pmo-bantam และ U6 จาก RNA ทั้งหมด 600 ng ด้วยเอนไซม์ SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) โดยใช้ไพร์เมอร์ pmo-bantam_RT primer หรือ U6 Reverse primer (ตารางที่ 2.8) จากนั้นตรวจสอบการแสดงออกของ miRNA ด้วยเทคนิค real-time PCR โดยใช้ U6 เป็น internal control ด้วยเอนไซม์ SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad)

2.3.6 การตรวจสอบการแสดงออกของ mRNA เป้าหมายในเนื้อเยื่อของกิ้งกูดดำ

mRNA เป้าหมายของ pmo-bantam คือ Kunitz-type protease inhibitor (KuSPI) ตามลำดับ จึงทำการตรวจสอบการแสดงออกของ mRNA เป้าหมายของ miRNA ที่สนใจที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว นำ RNA ที่สกัดได้จากข้อ 2.3.4 ซึ่งประกอบด้วย RNA จากเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เวลา 0 6 24 และ 48 ชั่วโมง ปริมาณ 300 นาโนกรัม มาสร้าง cDNA โดยใช้ไพร์เมอร์ oligo-dT และเอนไซม์ reverse transcriptase จากนั้นตรวจสอบการแสดงออกของ mRNA เป้าหมายด้วย real-time PCR ด้วยเอนไซม์ SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad) และ normalized การแสดงออกของยีนเป้าหมายด้วยยีน EF-1α โดยใช้ไพร์เมอร์ตามตารางที่ 2.10

ตารางที่ 2.10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ในการตรวจสอบการแสดงออกยีนเป้าหมายของ pmo-bantam pmo-miR-750 และ EF-1 α

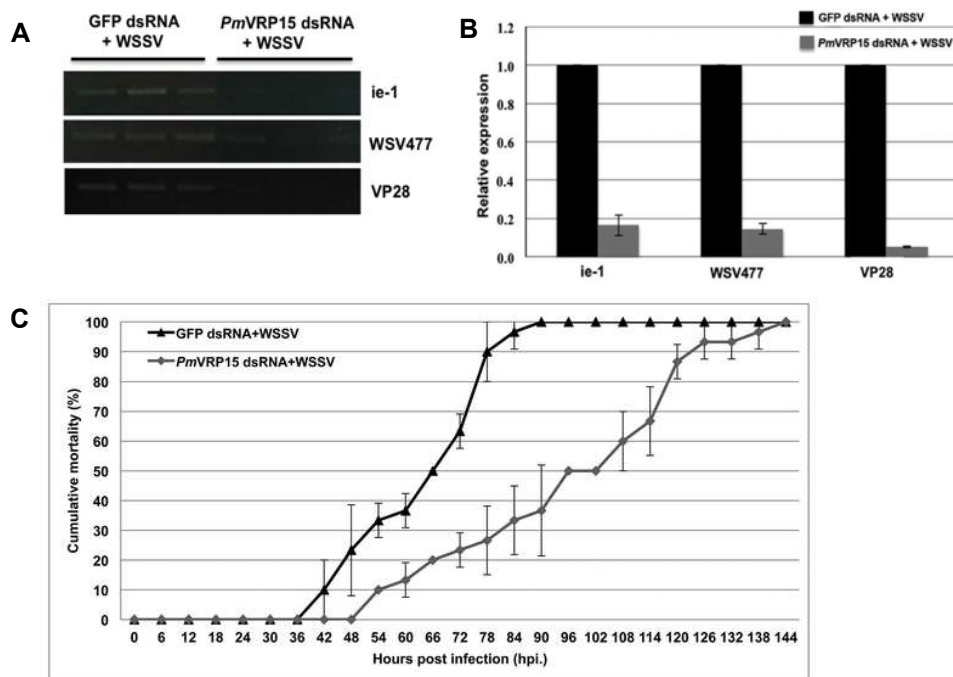
Primer	Sequence (5'-3')
KuSPI_F	AGTCTCATCTTCGTCGCCTCTG
KuSPI_R	GAACCTATGGAAACGGGCTTTGC
EF-1 α _F	GGTGCTGGACAAGCTGAAGGC
EF-1 α _R	CGTTCCGGTGATCATGTTCTTGATG

3. ผลงานวิจัย

3.1 ศึกษาหน้าที่ของ *PmVRP15* ต่อการการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งกุลาดำ โดยเทคนิค RNAi และ protein-protein interaction assay

3.1.1 ผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmVRP15* ต่อการแสดงออกของยีนไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งกุลาดำ

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนในเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกุลาดำ *Penaeus monodon* ที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยใช้เทคนิค suppression subtractive hybridization (SSH) โดย Prapavorarat et al. (2010) มีการค้นพบยีนชนิดใหม่ชื่อ viral responsive protein 15 (*PmVRP15*) ซึ่งมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นอย่างมากในกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว จึงคาดว่ายีนนี้น่าจะมีความสำคัญต่อการตอบสนองต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งกุลาดำ ในงานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาหน้าที่ของยีน *PmVRP15* นี้ จึงได้ใช้เทคนิค RNA interference (RNAi) ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmVRP15* และศึกษาผลกระทบของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmVRP15* ต่อการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของกึ่งกุลาดำ จากการทดลองฉีด dsRNA-*PmVRP15* เข้าไปในกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวพบว่าสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmVRP15* ได้ (รูปที่ 3.1A) เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนบ่งชี้ระดับการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในระยะต่างๆ ได้แก่ ยีน IE-1 (very early stage) ยีน WSV477 (early stage) และยีน VP28 (late stage) ในกึ่งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmVRP15* เทียบกับกึ่งกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย dsRNA-GFP พบว่ามียีนดังกล่าวการแสดงออกลดลง 83.5% 85.5% และ 94.8% ตามลำดับ (รูปที่ 3.1B) จากผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่ายีน *PmVRP15* มีความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว เมื่อตรวจสอบอัตราการตายสะสมของกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกลุ่มที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmVRP15* เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ยับยั้งการแสดงออกของยีน GFP พบว่าในกลุ่มที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmVRP15* มีอัตราการตายที่ช้ากว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม กลุ่มควบคุมจะตายครบ 100% หลังกึ่งติดเชื้อ 90 ชั่วโมง แต่ในกลุ่มที่ยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmVRP15* จะตาย 100% หลังกึ่งติดเชื้อ 102 ชั่วโมง โดยที่ 66-102 ชั่วโมงหลังกึ่งที่ยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmVRP15* มีอัตราการตายสะสมน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญประมาณ 50% (รูปที่ 3.1C)

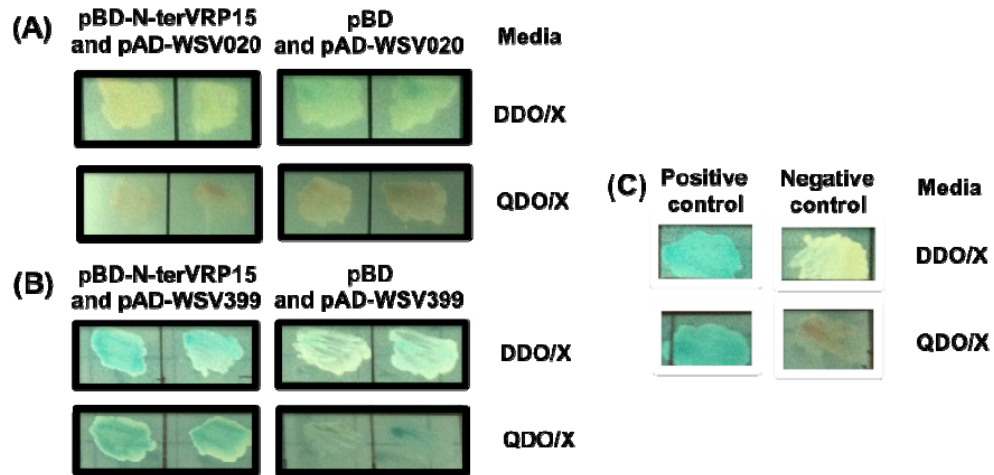


รูปที่ 3.1 ผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmVRP15* ต่อการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกิ้งก่าปลา (A) ทำการยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmVRP15* ในกิ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) โดยใช้ *PmVRP15*dsRNA (B) ศึกษาการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ระดับการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ในระยะต่างๆ หลังการยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmVRP15* ในกิ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยใช้เทคนิค real-time RT-PCR เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ฉีด GFPdsRNA ในสภาวะติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและ (C) ตรวจสอบอัตราการตาย หลังการยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmVRP15* ในกิ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว เทียบกับกลุ่มควบคุม

3.1.2 การค้นหาโปรตีนจากกิ้งก่าปลาและโปรตีนจากเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน *PmVRP15* โดยใช้เทคนิค Yeast two-hybrid screening

ในงานวิจัยนี้ใช้เทคนิค Yeast two-hybrid screening เพื่อค้นหาโปรตีนในเซลล์เม็ดเลือดของกิ้งก่าปลาที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว และโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาว ที่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน *PmVRP15* ได้ โดยสร้าง bait vector เพื่อใช้ในการ screen จากการทดลองพบว่า bait vector ที่มียีนของ *PmVRP15* (pGBKT7-*PmVRP15*) ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ยีสต์ และโปรตีน *PmVRP15* ไม่กระตุ้นให้เกิด autoactivation อย่างไรก็ตามไม่พบโปรตีนที่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน *PmVRP15* ได้ ซึ่งคาดว่าสาเหตุจากการที่โปรตีน *PmVRP15* มีส่วนของ transmembrane ทำให้โปรตีนไม่สามารถเข้าไปเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนอื่นๆ ภายในนิวเคลียสได้ ดังนั้นจึงทำการทดลองโดยตัดส่วนที่เป็น transmembrane ของโปรตีน *PmVRP15* ออก และนำยีน *PmVRP15* เฉพาะส่วนที่ code ให้ด้านปลาย N (*PmVRP15*-N) และเฉพาะส่วนที่ code ให้ด้านปลาย C (*PmVRP15*-C) มาสร้าง bait vector pGBKT7-N-*PmVRP15* และ pGBKT7-C-*PmVRP15* ตามลำดับ เพื่อใช้ในการ screen จากการทำ Yeast two-hybrid screening ไม่พบโปรตีนจากเซลล์เม็ดเลือดกิ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ที่เกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน *PmVRP15* ทั้งสองส่วน อย่างไรก็ตามพบโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาว 2 ชนิด คือ WSV399 และ WSV020 ที่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน

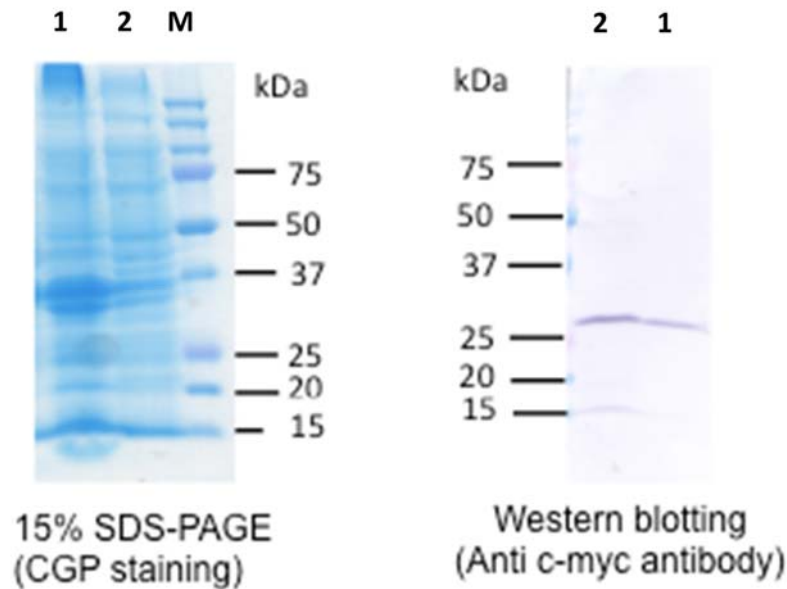
PmVRP15_N ได้ แต่ไม่พบโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน *PmVRP15_C* ได้ จากนั้นทำการยืนยันผล Yeast two-hybrid screening โดยการทำ Co-transformation ระหว่างเวกเตอร์ที่ผลิตโปรตีน WSV399 และ WSV020 กับเวกเตอร์ pGBKT7-N-*PmVRP15* ที่ผลิตโปรตีน *PmVRP15_N* พบว่ามีเฉพาะโปรตีน WSV399 เท่านั้นที่สามารถจับกับ โปรตีน *PmVRP15_N* ได้ (รูปที่ 3.2)



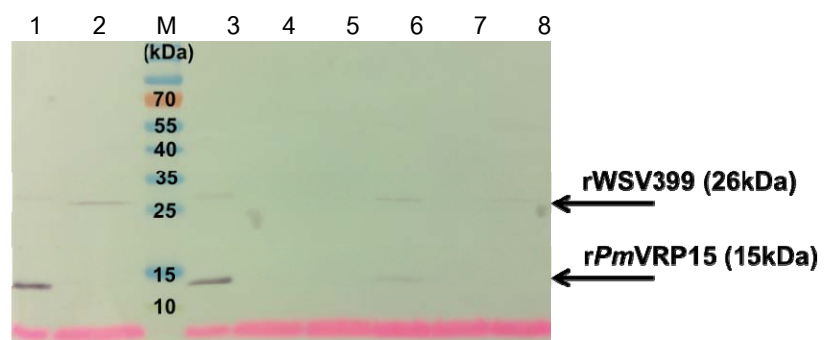
รูปที่ 3.2 การตรวจสอบการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน *PmVRP15* และโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยการทำให้ co-transformation ระหว่าง (A) โปรตีน *PmVRP15-N* กับ WSV020 (B) *PmVRP15-N* กับ WSV399 (C) แสดงตัวควบคุมที่ให้ผลบวกและลบ

3.1.3 ยืนยันการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน *PmVRP15* กับ โปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาว ด้วยเทคนิค Co-Immunoprecipitation (Co-IP)

จากผลการทดลองข้างต้นพบว่า โปรตีน WSV399 เกิดปฏิสัมพันธ์กับส่วน N-terminus ของโปรตีน *PmVRP15* ได้ ดังนั้นจึงทำการยืนยันผลการจับกันของโปรตีนทั้งสองตัวด้วยเทคนิค Co-Immunoprecipitation โดยการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ของโปรตีน *PmVRP15* (*rPmVRP15*) และ WSV399 (*rWSV399*) ในระบบ *E. coli* โดยได้ทำการโคลนยีน WSV399 เข้าสู่เวกเตอร์ pBAD/Myc-His A และนำไปแทรนส์ฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* TOP10 เพื่อผลิตโปรตีน *rWSV399* โดยโปรตีนที่ผลิตได้นี้มีทั้ง c-Myc tag และ 6x His-tag อยู่ทางด้านปลาย C ซึ่งจะมีขนาดประมาณ 26 kDa จากการทดลองพบว่าสามารถผลิตโปรตีน *rWSV399* ซึ่งมีขนาดเท่ากับที่คาดการณ์ไว้ได้ โดยพบโปรตีนอยู่ทั้งในส่วน inclusion bodies และส่วน soluble (รูปที่ 3.3) ในการทดลองนี้ เลือกนำโปรตีนในส่วน soluble มาทำการทดลองต่อ โดยนำไปทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยใช้ Ni-NTA affinity chromatography แล้วนำไปทำ Co-Immunoprecipitation กับโปรตีน *rPmVRP15* จากการทดลองพบว่าโปรตีน *PmVRP15* สามารถจับกับ WSV399 ได้ (รูปที่ 3.4)



รูปที่ 3.3 โปรตีน rWSV399 ที่ผลิตได้จาก *E. coli* หลังจากเหนี่ยวนำให้เซลล์ผลิตโปรตีนโดยใช้ 0.02% Arabinose เก็บเซลล์มาทำให้แตกโดยการ sonication จากนั้นแยกส่วน inclusion bodies (1) และส่วน soluble protein (2) มาตรวจสอบโปรตีนที่ผลิตได้ โดยใช้ CGP staining (ซ้าย) และ Western blot โดยใช้ Anti c-Myc antibody (ขวา)

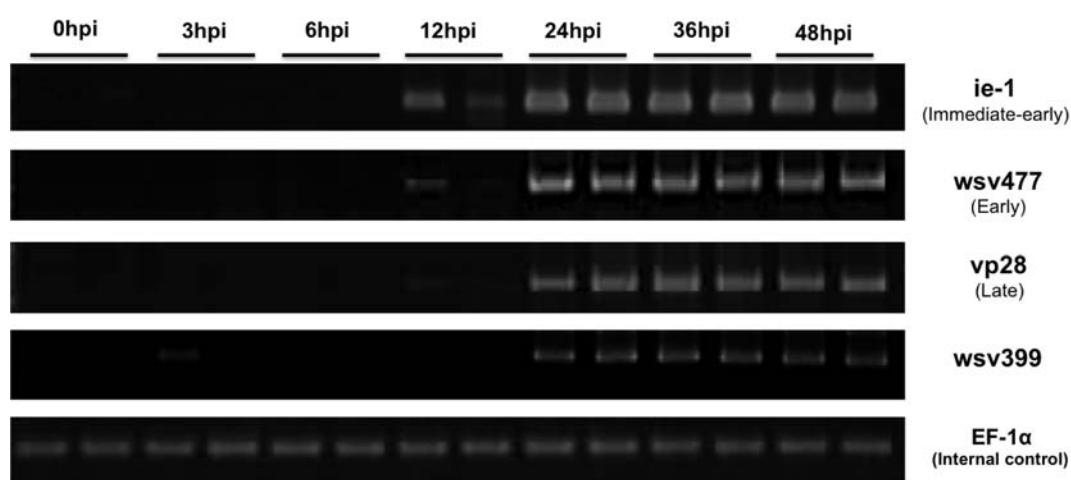


รูปที่ 3.4 ทดสอบการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน PmVRP15 กับโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาว WSV399 โดยเทคนิค Co-immunoprecipitation

- Lane: 1 โปรตีน rPmVRP15 ที่บริสุทธิ์
- 2 โปรตีน rWSV399 ที่บริสุทธิ์บางส่วน
- 3 Flow through หลังโปรตีนผสม rPmVRP15-rWSV399 ผ่าน Anti-c-Myc agarose bead
- 4 Wash fraction no.1 หลังโปรตีนผสม rPmVRP15-rWSV399 ผ่าน Anti-c-Myc agarose bead
- 5 Wash fraction no.2 หลังโปรตีนผสม rPmVRP15-rWSV399 ผ่าน Anti-c-Myc agarose bead
- 6 Elution fraction fraction จากคอลัมน์ที่ทำการทดลอง
- 7 Elution fraction fraction จากคอลัมน์ควบคุมที่ผ่านโปรตีน rPmVRP15 เพียงอย่างเดียว
- 8 Elution fraction fraction จากคอลัมน์ควบคุมที่ผ่านโปรตีน rWSV399 เพียงอย่างเดียว

3.1.4 ตรวจสอบการแสดงออกของยีนของไวรัส WSV399 ในเม็ดเลือดกึ่งกลาดำหลังติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

เนื่องจากการศึกษาการเกิดปฏิสัมพันธ์กันระหว่างโปรตีน *PmVRP15* และโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาว พบว่าโปรตีน *PmVRP15* สามารถจับกับโปรตีน WSV399 ได้ จึงทำการศึกษาการแสดงออกของยีนไวรัส wsv399 เพื่อศึกษาว่าเป็นยีนที่แสดงออกอยู่ในระยะใดหลังจากกึ่งกลาดำติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว เมื่อเปรียบเทียบกับยีน ไวรัสที่เคยมีการศึกษาว่ามีการแสดงออกของยีนช่วงใดหลังการติดเชื้อ ประกอบด้วย ยีน *ie-1* มีการแสดงออกในระยะ Immediate early ยีน *wsv477* มีการแสดงออกในระยะ Early และยีน *vp28* มีการแสดงออกในระยะ Late พบว่ายีน *wsv399* มีการแสดงออกในระยะ Late เหมือนยีน *vp28* (รูปที่ 3.5)



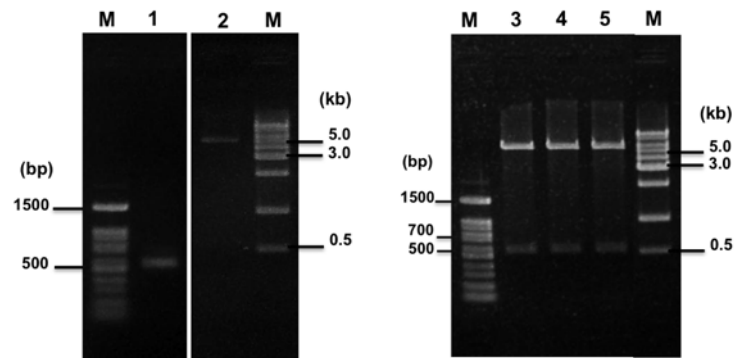
รูปที่ 3.5 แสดงผลการแสดงออกของยีน wsv399 ในเม็ดเลือดกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ 0 3 6 12 24 36 และ 48 ชั่วโมงหลังจากการติดเชื้อ

3.1.5 ศึกษาบริเวณที่มีการแสดงออกของโปรตีน WSV399 ในไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยเทคนิค Western blot และ Immunoelectron microscopy

การศึกษาริเวณที่มีการแสดงออกของโปรตีน WSV399 ในไวรัสตัวแดงดวงขาวจำเป็นต้องใช้ antibody ที่จำเพาะกับโปรตีน WSV399 จึงเริ่มจากการผลิตพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ wsv399 จากผลการทดลองในรูปที่ 3.6 พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนยีน wsv399 ที่มีขนาด 522 คู่เบส และทำการสร้างพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ pET16b-wsv399 (rpET16b-wsv399) ได้สำเร็จ จากนั้นนำ rpET16b-wsv399 เข้าสู่ *E. coli* BL21 (DE3) เพื่อทำการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ WSV399 (rWSV399) พบว่าหลังจากเหนี่ยวนำด้วย IPTG 3 ชั่วโมง สามารถผลิตโปรตีนได้สำเร็จ โดยโปรตีน rWSV399 มีขนาดประมาณ 26 กิโลดัลตัน และโปรตีนส่วนมากอยู่ในส่วนของ Inclusion bodies (รูปที่ 3.7) เนื่องจากโปรตีน rWSV399 มีการติด Histidine tag ดังนั้นจึงนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Ni-NTA (รูปที่ 3.8) นำโปรตีนที่บริสุทธิ์ไปผลิต antibody (anti-WSV399) และทำการตรวจสอบความจำเพาะของ anti-WSV399 (รูปที่ 3.9)

เนื่องจากต้องการหาบริเวณที่โปรตีน WSV399 ที่แสดงออกบนไวรัสตัวแดงดวงขาว จึงทำการสกัดไวรัสจาก Crayfish (*P. clarkii*) และทำการตรวจสอบคุณภาพของไวรัสที่สกัดได้ด้วยเทคนิค Transmission electron microscopy (รูปที่ 3.10) จากนั้นนำไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ได้ไปตรวจหาบริเวณที่โปรตีน rWSV399 มี

แสดงออกด้วยเทคนิค Western blot หลังจากทำการแยกไวรัสออกเป็นสองส่วนคือ Envelope และ Nucleocapsid พบว่าโปรตีน WSV399 มีการแสดงออกทั้งสองส่วน (รูปที่ 3.11) จึงสามารถสรุปได้ว่า โปรตีน WSV399 เป็นโปรตีนโครงสร้างของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่อยู่ในส่วนของ Tegument ซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่ระหว่างส่วนที่เป็น Envelope และ Nucleocapsid และได้ใช้เทคนิค Immunoelectron microscopy ในการยืนยันหาบริเวณที่โปรตีน WSV399 ที่แสดงออกโดยการติดตามเม็ดทองขนาด 18 nm ที่ติดอยู่กับ 2nd Antibody ที่ใช้ติดตาม mouse anti-WSV399 antibody WSV399 จากผลการทดลองพบว่าโปรตีน WSV399 มีการแสดงออกอยู่ในส่วนของ Tegument ในไวรัสตัวแดงดวงขาว (รูปที่ 3.12)

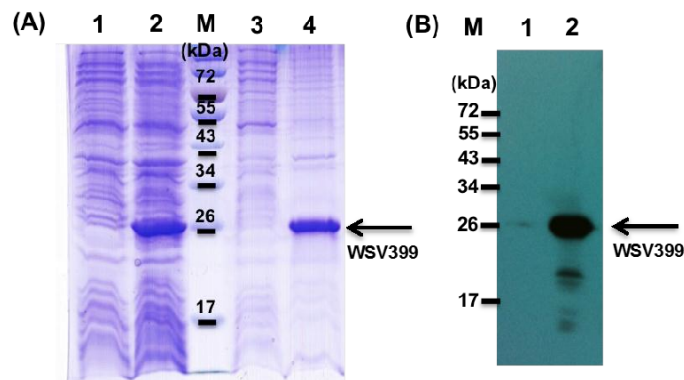


รูปที่ 3.6 แสดงผลการสร้างพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ pET16b-wsv399 โดย Lane M คือ DNA marker

Lane 1 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน wsv399 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI/BamHI*

Lane 2 คือ เวกเตอร์ pET16b ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *BamHI*

Lanes 3 ถึง 5 คือ โคลน Positive ที่ถูกคัดเลือกโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *BamHI*



รูปที่ 3.7 แสดงผลการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ WSV399 (rWSV399) ใน *E. coli* BL21(DE3) ทำการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนด้วย (A) 12.5% SDS-PAGE และ (B) Western blot

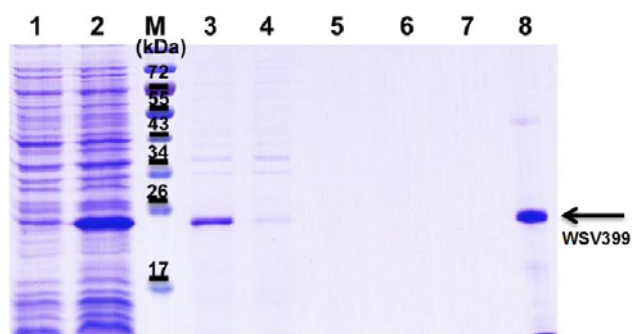
Lane M คือ Prestained protein marker (Fermentas)

Lane 1 คือโปรตีน rWSV399 หลังจากเหนี่ยวนำการแสดงออกด้วย IPTG เป็นเวลา 0 ชั่วโมง

Lane 2 คือโปรตีน rWSV399 หลังจากเหนี่ยวนำการแสดงออกด้วย IPTG เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

Lane 3 โปรตีน rWSV399 ในส่วนของ Soluble

Lane 4 คือ โปรตีน rWSV399 ในส่วนของ Inclusion bodies



รูปที่ 3.8 แสดงผลการทำโปรตีน rWSV399 ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Ni-NTA โดย

Lane M คือ Prestained protein marker

Lane 1 คือโปรตีน rWSV399 หลังจากเหนี่ยวนำการแสดงออกด้วย IPTG เป็นเวลา 0 ชั่วโมง

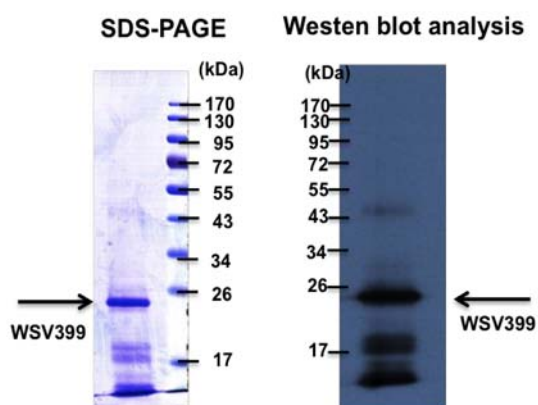
Lane 2 คือโปรตีน rWSV399 หลังจากเหนี่ยวนำการแสดงออกด้วย IPTG เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

Lane 3 คือ โปรตีน rWSV399 ที่ละลายออกมาจากส่วนของ inclusion bodies

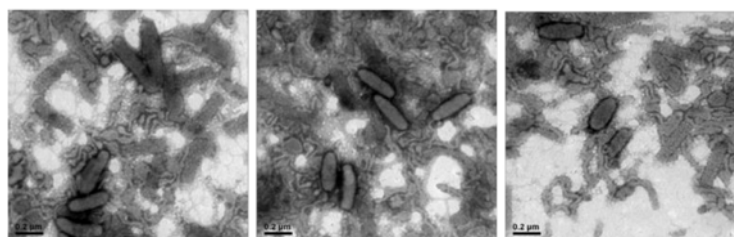
Lane 4 คือ flow-through fraction จากคอลัมน์ Ni-NTA

Lanes 5-7 คือ wash fraction no.1-3 จากคอลัมน์ Ni-NTA

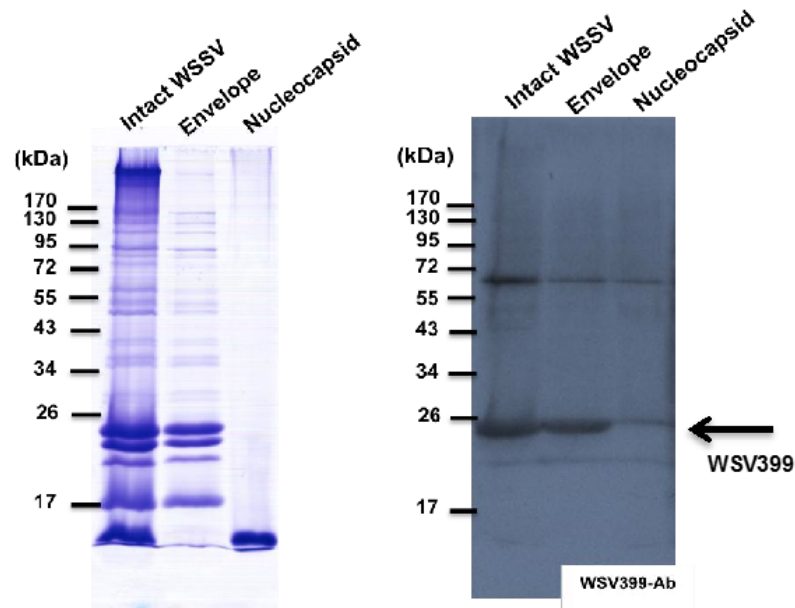
Lane 8 คือ elution fraction ที่มีโปรตีน rWSV399 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากคอลัมน์ Ni-NTA



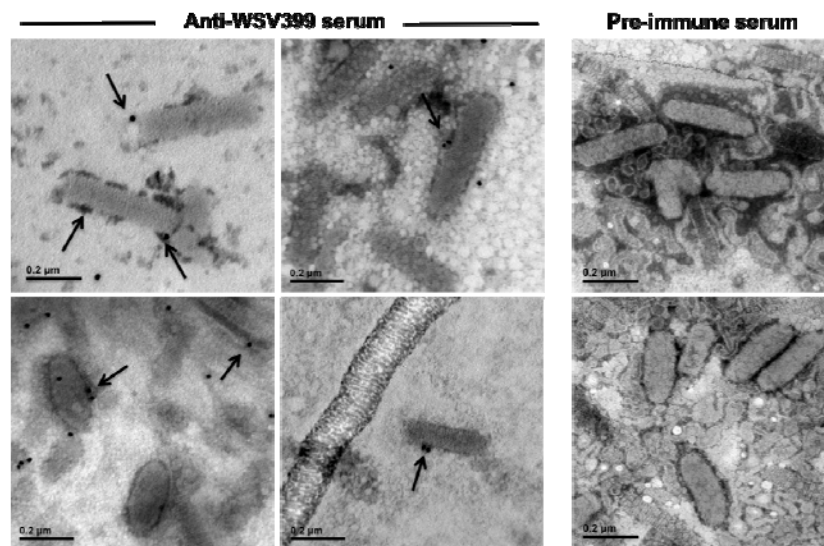
รูปที่ 3.9 แสดงผลการตรวจสอบความจำเพาะของ anti-WSV399 polyclonal antibody ที่ผลิตจากหนูกับโปรตีนรีคอมบิแนนท์ WSV399 ด้วยเทคนิค Western blot



รูปที่ 3.10 ตรวจสอบคุณภาพของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่สกัดจาก Crayfish (*Procambarus clarkii*) ด้วยเทคนิค Transmission electron microscopy



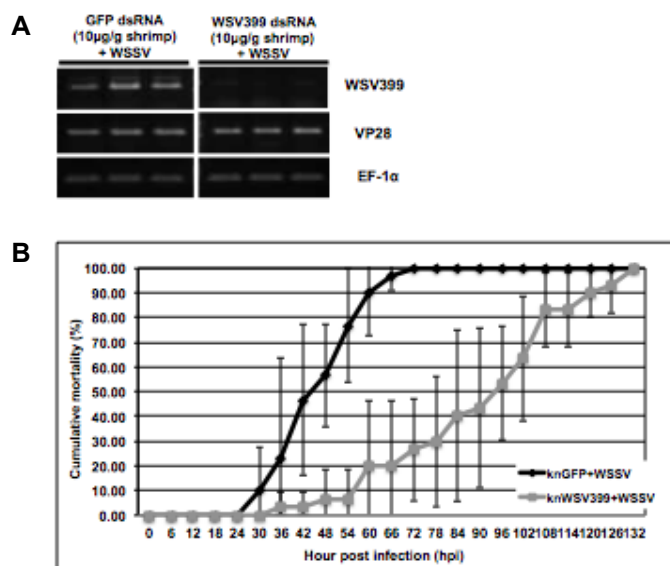
รูปที่ 3.11 แสดงผลการตรวจสอบบริเวณการแสดงออกของโปรตีน WSV399 โดยทำการแสดงผลการวิเคราะห์โปรตีนไวรัสตัวแดงดวงขาวที่สกัดได้ (Intact WSSV) และโปรตีนไวรัสที่ทำการแยกส่วนเป็น Envelope และ Nucleocapsid ด้วยเทคนิค SDS-PAGE (รูปด้านซ้าย) และตรวจสอบบริเวณการแสดงออกของโปรตีน WSV399 ในไวรัสตัวแดงดวงด้วยเทคนิค Western blot (รูปด้านขวา) ซึ่งจะใช้ antibody ที่จำเพาะกับโปรตีน WSV399 (anti-WSV399) เป็นตัวตรวจหาบริเวณที่มีการแสดงออกของโปรตีน WSV399 ในแต่ละส่วนของโปรตีนไวรัสตัวแดงดวงขาว



รูปที่ 3.12 แสดงผลการตรวจสอบบริเวณการแสดงออกของโปรตีน WSV399 บนตัวไวรัสตัวแดงดวงขาว ด้วยเทคนิค Immunoelectron microscopy โดยจะใช้การติดตามเม็ดทองที่มีขนาด 18 nm ที่ใช้ติดอยู่กับ secondary antibody ที่มีความจำเพาะต่อ anti-WSV399

3.1.6 ตรวจสอบความเกี่ยวข้องของยีน WSV399 กับการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ

จากรายงานผลงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าโปรตีน *PmVRP15* สามารถจับกับโปรตีน WSV399 ของไวรัสตัวแดงดวงขาวซึ่งเป็นโปรตีนโครงสร้างส่วน Tegument แต่ยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่ชัด ในการทดลองนี้ได้ใช้เทคนิค RNA interference ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน WSV399 และตรวจสอบความเกี่ยวข้องของยีนกับการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้ง ในส่วนแรกได้ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน VP28 ซึ่งเป็นยีนโครงสร้างส่วน envelope ของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่มีการแสดงออกในระยะ late ในกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ซึ่งนำมาใช้เป็นยีน marker ในการตรวจสอบความสามารถในการเพิ่มจำนวนของไวรัสในกุ้งที่ติดเชื้อ พบว่าหลังการยับยั้งการแสดงออกของยีน WSV399 ในกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว การแสดงออกของยีน VP28 ไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 3.13A) เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มทดลอง (กลุ่มที่ยับยั้งการแสดงออกของยีน WSV399) และกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ยับยั้งการแสดงออกของยีน GFP) แต่เมื่อตรวจสอบอัตราการตายของกุ้ง พบว่าในกลุ่มกุ้งที่ยับยั้งการแสดงออกของยีน WSV399 ที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวมีอัตราการตายน้อยกว่ากลุ่มควบคุม (รูปที่ 3.13B) จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่ายีน WSV399 มีส่วนเกี่ยวข้องในการเพิ่มจำนวนไวรัสของกุ้ง โดยในงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าไวรัสในกลุ่มที่มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายคู่ ใช้โปรตีนโครงสร้างส่วน Tegument ในระบบการขนส่งไวรัสจาก cytoplasm เข้าสู่ nucleus (Kelly et al. 2009) และยังมีรายงานว่าโปรตีน VP26 ซึ่งเป็นโปรตีนโครงสร้างส่วน Tegument ของไวรัสตัวแดงดวงขาว สามารถจับกับโปรตีน actin (Xie and Yang 2005) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีการรายงานว่าทำงานในระบบการขนส่งไวรัส ทำให้สามารถสรุปได้ว่าโปรตีน WSV399 อาจจะเกี่ยวข้องในการเพิ่มจำนวนไวรัสของกุ้ง ในส่วนของระบบการขนส่งไวรัสจาก cytoplasm เข้าสู่ nucleus



รูปที่ 3.13 แสดงผลการตรวจสอบความเกี่ยวข้องของยีน wsv399 กับการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำด้วยเทคนิค RNA interference (A) ตรวจสอบการแสดงออกของยีน VP28 ในเซลล์เม็ดเลือดกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวหลังยับยั้งการแสดงออกของยีน (B) ตรวจสอบอัตราการตายของกุ้ง เมื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน WSV399

3.2 ศึกษาการจัดเรียงตัวของยีนและบริเวณควบคุมของยีน *PmVRP15* ในจีโนมของกุ้งกุลาดำ

3.2.1 การจัดเรียงตัวของยีนและบริเวณควบคุมของยีน *PmVRP15* ในจีโนมของกุ้งกุลาดำ

เนื่องจากยีน *PmVRP15* มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นหลังจากกุ้งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว จึงสนใจศึกษาการควบคุมการแสดงออกของยีน *PmVRP15* โดยจากผลการศึกษา ก่อนหน้านี้มีข้อมูลยีนที่ครบสมบูรณ์ซึ่งมีขนาด 759 bp โดยมีส่วน 5'UTR ขนาด 101 bp ส่วน 3'UTR ขนาด 244 bp และมี ORF ขนาด 414 bp จากการศึกษาการจัดเรียงตัวของยีน *PmVRP15* โดยการออกแบบไพรเมอร์จากข้อมูล cDNA และนำมาทำ PCR เพิ่มจำนวนขึ้นยีนจากจีโนมิกดีเอ็นเอ แล้วนำชิ้นยีนที่ได้ไปทำการโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ TA เพื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมิกดีเอ็นเอไปเปรียบ เทียบกับลำดับของนิวคลีโอไทด์ของ *PmVRP15* cDNA พบว่า ยีน *PmVRP15* ประกอบด้วย 4 exons ขนาด 50 161 122 และ 138 bp แทรกด้วย 3 introns ขนาด 541 113 และ 430 bp โดยพบว่า exon 1 อยู่ในส่วน 5'UTR และส่วนของ open reading frame ของยีน *PmVRP15* ประกอบด้วย exon 3 ส่วน ตั้งแต่ exon 2-4 (รูปที่ 3.14) เมื่อวิเคราะห์บริเวณรอยต่อระหว่าง exon และ intron ทุก ๆ ช่วงรอยต่อ พบว่า มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 5'-spliced site และ 3'-spliced site เป็นลำดับอนุรักษ์ GT และ AG ตามลำดับ

ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่ควบคุมการแสดงออกของยีน *PmVRP15* โดยใช้เทคนิค genome walking โดยสามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์บนจีโนมทางด้านปลาย 5' ได้ขนาดประมาณ 2 กิโลคู่เบส เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บนจีโนมทางด้านปลาย 5' ไปทำนายส่วนที่เป็นโปรโมเตอร์และส่วนที่ควบคุมการแสดงออกของยีน พบ TATA box หนึ่งตำแหน่งอยู่ที่บริเวณตำแหน่ง -26 และ transcription factor binding site หลายตำแหน่ง เช่น CAAT enhancer-binding protein (C/EBP) 9 ตำแหน่ง Oct-1 2 ตำแหน่ง และ Sp1 1 ตำแหน่ง (รูปที่ 3.15)

```

-67 TCCATGAAATGACTCACAGTGCATGCTTTGTGGCTCAGTAATATAAAGCACAGTTCCCAC -8
      → (+1) (Exon1)
-7 GCACTTCATCTCAGTGGGTGTCACCGAGCCAAGAGAACGTTCACTCGATCACCCTCT 53
54 CGTTCCTTGATgtaagtatacatgtgtgtgtgagggagagagggagagggagagagta 113
      (Intron1)
114 ataactagttaataatcagtaataataataataaatttttaataatttagctttattt 173
174 catttggttataaaagggtttcttgggtgtaacaggctgtttgtttatatttgccttctaaata 233
234 accccctttgtgaaagggtcctgtgagcaagggaatggttaccatccactggcagtgagataa 293
294 ttatctgtatgtaacctgttttttttttttaacaaaaacaaaaacgaaaatataattca 353
354 caatggcaccaagtcaaaaaagaaaaaaattaagaatgaaaaaaatagctgtaaatgttt 413
414 atcctcggaccttcccgcccatgctctagcgggataaaaaatcacattcgaaaagaagcac 473
474 aatattctatctacataaaaaagttatactctacatgtatacaaaaaatctatctgaaat 533
534 ctctgtaggcacgcagggacggtcctcctaagatccacagcactaaccgcgtgttttcc 593
      (Start) (Exon2)
594 tcatcccatagCTACGCAATGTTAACAGAGGACTTAGTAAACCTGGTGTACGAGGTGTG 653
      M L T E D L V N L V Y E V C
654 TCAAGAGAAGAAGCTCGCAGCGCGCGTGAATGCATCCTTCAGTCCGCTTCCATACCATT 713
      Q E K K L R A A V K C I L Q C A S I P F
714 CGTCTCAACAATAGCCGTAGCTCTGTATATGGGCCCCCTGGGCGTCTTGCTGGgttagctg 773
      V S T I A V A L Y M G P L G V L L G
774 tgttctattcttcatttcatttcgtgatgataatgattatgtaaatggtggttaatagtga 833
      (Intron2)
834 taaaaatagtagtagtaataaattacaggaactctccctttcagGTGGCGCTGTAGGT 893
      (Exon3) G A V G
894 ACTGGGATCTCCTACGTCTATGCTAGGGGGAAGTTCAAAGCGTCGTTAGCATTATCAGG 953
      T G I S Y V Y A R G K F K S V V S I I R
954 GACGACTTGACTCCACAGGAAAGGGAGAGGCTCATGATGAGGGTCCGGgttaagggttcctg 1013
      D D L T P Q E R E R L M M R V R
1014 gcgtttgttgcggaagatgataataatgagtgattacagtttttattcttattattat 1073
      (Intron3)
1074 tttcatgaaccctgtcattgtcttttagtctcatagctaccagctctgtatacatagttt 1133
1134 tcaatatctatgcatccacactagtagcttttatatagagagaattaatgaatgattaaagg 1193
1194 agcgtcagggaattcatccattaacatacaacacagaacaaataatgaatatccgat 1253
1254 aagtagcataagccatctgtgtatgctccatataaaaaataatccatacatctgtgattgc 1313
1314 gtttagatattccaattttctgtaaattatttgttaggcctgtggcttccattagacat 1373
1374 gtaaaaggctttaagagaatatcattcaaacataagtaattcgttcacctccttttagGC 1433
      (Exon4) A
1434 CGCTCTCGTAGACCTTGGAGTCGCTGTGCGGGCCCTCTGTGGCCTTCGTCAGCTCACCGA 1493
      A L V D L G V A V G A S V A F R Q L T E
1494 GCCCATGAAGTCGGAGATCGCTGCTACTGTCAAGAAGTACTTGGAGTATGACCACAACAT 1553
      P M K S E I A A T V K K Y L E Y D H N M
1554 GTCAGTAGAGCATTAAATGCCTAAAAGACTGTTCAAGGTGAATGGCGAGAACGACGGTTTC 1613
      S V E H *
1614 TTTTCGTTTGCATTGTGTTAGCGAAGATGGGTTGCTGTTAGTACTACTTTTGGAAATTG 1673
1674 GATTTGTTTATGTTGAGGCAAAAATGTGAAAGAGACAGTTCCAAAATAACAAATAAAA 1733
1734 ACTATCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1793
1794 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1813

```

รูปที่ 3.14 การจัดเรียงตัวของยีนบนจีโนม *PmVRP15* ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ intron ที่แทรกอยู่ระหว่าง exon (แถบสีเหลือง) ของยีน *PmVRP15* โดยส่วนของ Start codon แสดงแถบสีแดงตัวอักษรหนาอยู่ใน exon ที่ 2 ตำแหน่งของ Transcription start site ถูกทำนายด้วยโปรแกรม Neural Network Promoter Prediction และส่วนของโปรโมเตอร์ของยีน *PmVRP15* คือบริเวณที่ขีดเส้นใต้

-2047 CCTAGATGGAAAGAGAAAAAATACCTTTGAGGTTCGGCTGCTGAGCTGCAAGGAC -1988

-1987 TCCGGATTTCATCGTCCACTCAACAGCCACAGCTTGACCACTTACACCAAGACAGCTACA -1928

-1927 GTTGTAAAGCTCTTCTCAGAGACAAGATGATTTGTGAATACCTTTCTGGGCTGCAGCAC -1868

-1867 CATTTCATACCTCCAATGACGTTCCTGTGCAATTCACCAATGGAGCCCTACCCAGGCA -1808

-1807 ACAAGCAAGTTATACGGGCGAGTAAGATTAATGCTTCGGCAAGGTGTGCTTACAA -1748

-1747 SCCCATCGTTTCGGCGGTAGTTAGGAAGAAATTTGTACATCAGTTCTGCATCCACTAC -1688

-1687 ASGAGTCTTAAGTAAACCAACCCAGATTCGTATCCACTACCTTGCACATGATGAGATCCT -1628

-1627 CAACTCCCACTCAGSCCAGATGTGCTATACAGTTTASACAACCGCTCAGCAATTTGGGT -1568

-1567 CATCTCCATCCATCCAGAGGTCGSCCAAGAGCTGCATTCATGATCGCAACCGTCTTTT -1508

-1507 TCACCTAAACTTGGATAACTTTGGCTTTCGGAGAACCAATGAASCTCCTTGGGTGT -1448

-1447 TATTAGAAAGCATGATGATGTCCCAATACGAAAAATGGCTGCCGGAATGCTACTTT -1388

-1387 GGGGAGTGCAGGAGGTGTTCGGTTCCTTGCACCTGTGGTTCTTTAGAGCTATATTG -1328

-1327 AGAGGCTTTCTTCCACCGTAAGGTCCCTTTCGAAGCTTACTAAGAAAGGCATAAAATTTA -1268

-1267 ACTGGGCTGATGCAAGCAGCAACCCCTTTGATTCCTTGAATGSAAGCTCTCTGGAAGCCC -1208

-1207 TTGTCCTCCCTCTCTAGACTTCAGCAGACCCCTTGAAGTACATACATGCAATGGAGTCT -1148

-1147 TGGGAGCTGCTCTTATCCAAATGTGATGSCCATTCGGAAGCATTCGATTGTAATTTCTCG -1088

-1087 CAAGGTCTTCTGAATTTACTGTTCAGGCTTGCATGCTTCTCTCCGAAAAGGATTTGA -1028

-1027 GTATACCCAGAGGTATACCCAGAGTTGTTTATTATTTATTTTATTGTTTATTATTTA -968

-967 TTTTCTTTCTTTTATTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTA -908

-907 TTAGTCCGATGCTCTAACAATTCGGCCACCGCGGCCCTTACATTTTAAATAACTTTTAAATA -848

-847 AAAAGCATCTCACCAGAGCAGAAATATGTTACTATATGCTCTCTCTTTGTAAGTACCAT -788

-787 GTAAATACCTTGTTCGATGTCCAGCAGCTATTCATTTGAGCCGACACCCAGAGCTG -728

-727 SCTGAACCTTGTGTTTCTGCTTGTGCTCAATATTTTAAAAATTCATTTTGTAAATTT -668

-667 TTATACACACTTATATACCTTGTGATACCTTATGATTTCATTTGTTCTCAACAGAAAT -608

-607 AATTCACTTATTTACTTATTCAGTCTCTCAAAATTCAGAGAAATCCAGAAATCCAGCCAA -548

-547 CCTGGGCTCAGGCTGGCTCAGCCGTAGTGAACAGCTCCGGCTCTTCACTACAAAGAG -488

-487 GATGAAACCGATAGATGCGCTCTATCTTTGGCAATAACCGTACGGCTCTGAAACAGTAA -428

-427 TCACCTGCTGCTGGTCTTCCGCGCTTGAATGCTGCGAGCTGTCAGAGATTTTITGTCG -368

-367 GCATCAATGATCAICAAATGCAATTTTATCATGTGAATTCGGTGATAAGAACCTTAGT -308

-307 ACCTAAATTTACATACCTTTTGAAGTATTTATTTGTATTTGTAACTTAATGATAAT -248

-247 GTCATATAACTTTTACAGCAAAAAGAGAAATGAGAAATAAACCTTAAGCTGATAATGGCT -188

-187 TTTATTTTATTTTATTTTATTTTTCAAATTAATTCAGAAATCGGTCTTGGGTGTTATGAG -128

-127 TGTCTTATGTCAAATTAATGTCAGGAGAAAAAGTCTTCAGGTTCAGGTGCAAAACGTCA -68

-67 TCCATGAAATGAGTCACAGTCAATGCTTTCGGCTCAGTAACTAAGACAGTTCACAC -8

-7 GCACCTTCAATCAGTTCGGCTGTCACCGAGCCAAGAGAACGTTCACTCGATCACCACCTCT 53

54 CGTTCCTTGATgtaagtatacatgtgtgtgtgagggagagagggagagagagagagta 113

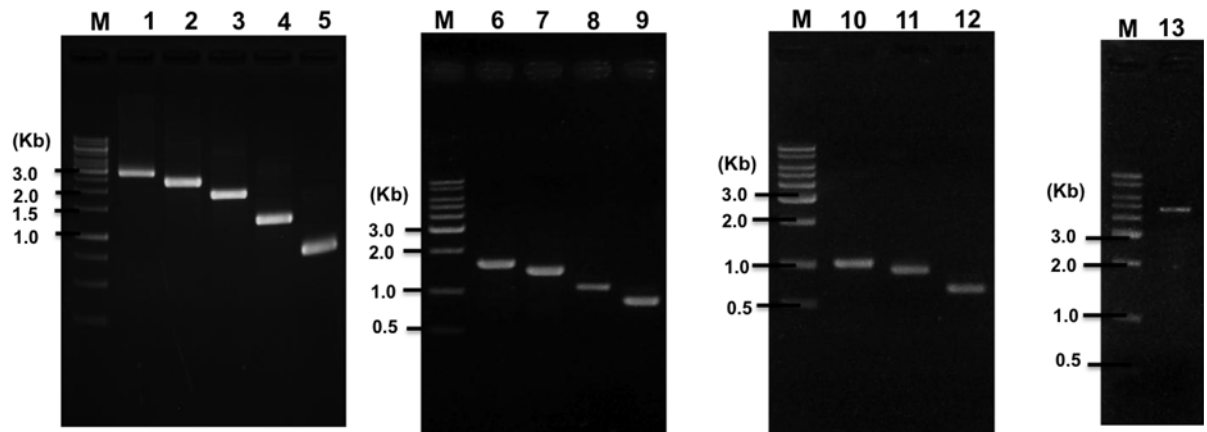
114 ataactagtttaataatcagtaataataataataataatTTTTAATAATTTAGCTTTATTT 173

174 catTTgttacaagggttttcttgggtgaacaggtgtttgtttatatttcttcttaata 233

รูปที่ 3.15 ลำดับของนิวคลีโอไทด์บริเวณที่ควบคุมการแสดงออกของยีน *PmVRP15* โดยเทคนิค Genome Walking

3.2.2 ศึกษาการควบคุมการแสดงออกของยีน *PmVRP15*

จากผลการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 5' flanking promoter ของยีน *PmVRP15* พบว่ามีขนาดประมาณ 2 พันกิโลเบส เนื่องจากต้องการหาบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน *PmVRP15* จึงทำการตัดส่วนของ 5' flanking promoter ให้มีขนาดเล็กลงเรื่อยๆ (Narrow down) โดยใช้เทคนิค PCR โดยในส่วนแรกได้ทำการจะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -2047 ถึง +612 (-2047/+612) -1621 ถึง +612 (-1621/+612) -1147 ถึง +612 (-1147/+612) -525 ถึง +612 (-525/+612) และ -92 ถึง +612 (-92/+612) (รูปที่ 3.16, Lane 1-5) จากนั้นทำการโคลนเข้าเวกเตอร์ pGL3 basic (Promega) เพื่อสร้างพลาสมิดรีคอมบิแนนท์สำหรับตรวจสอบความสามารถในการทำงานของโปรโมเตอร์ดังนี้ p(-2047/+612), p(-1621/+612), p(-1147/+612), p(-525/+612) และ p(-92/+612) จากนั้นนำพลาสมิดรีคอมบิแนนท์เข้าสู่เซลล์ S2 เพื่อตรวจวัดความสามารถในการทำงานของโปรโมเตอร์ จากผลการทดลองพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -1147 ถึง -92 น่าจะเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน *PmVRP15* เนื่องจากความสามารถในการทำงานของโปรโมเตอร์จะลดลงหลังจากทำการตัดส่วนของ 5' flanking promoter ให้มีขนาดเล็กลงเรื่อยๆ (รูปที่ 3.17) ดังนั้นจึงนำช่วง -1147 ถึง -92 ของ 5' flanking promoter มาทำให้มีขนาดเล็กลง (Narrow down) โดยใช้เทคนิค PCR ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -907 ถึง +612 (-907/+612) -727 ถึง +612 (-727/+612) -427 ถึง +612 (-427/+612) และ -208 ถึง +612 (-208/+612) (รูปที่ 3.16, Lane 6-9) จากนั้นทำการโคลนเข้าเวกเตอร์ pGL3 basic (Promega) เพื่อสร้างพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ p(-907/+612) p(-727/+612) p(-525/+612) p(-427/+612) และ p(-208/+612) จากนั้นนำพลาสมิดรีคอมบิแนนท์เข้าสู่เซลล์ S2 เพื่อตรวจวัดความสามารถในการทำงานของโปรโมเตอร์ จากผลการทดลองพบส่วนที่น่าสนใจสองตำแหน่งคือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -525 ถึง -427 ซึ่งคาดว่าจะมีตัวกดการแสดงออกของยีน (Repressor) มาควบคุมการแสดงออกของยีน *PmVRP15* เพราะหลังจากตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงนี้ออกไป พบว่าจะความสามารถในการทำงานของโปรโมเตอร์เพิ่มขึ้นประมาณ 50 % (รูปที่ 3.18) และอีกส่วนหนึ่งคือลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -427 ถึง -92 ซึ่งคาดว่าจะมีตัวกระตุ้นการแสดงออกของยีน (Activator) มาควบคุมการแสดงออกของยีน *PmVRP15* เพราะหลังจากตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงนี้ออกไป พบว่าจะความสามารถในการทำงานของโปรโมเตอร์จะลดลงประมาณ 70 % (รูปที่ 3.18) แต่เนื่องจากส่วนของโปรโมเตอร์ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -427 ถึง -92 มีความยาวมากเกินไป ทำให้คาดการณ์บริเวณที่มีความจำเพาะในการควบคุมการแสดงออกของยีนได้ยาก จึงทำการตัดส่วนของโปรโมเตอร์ให้มีขนาดเล็กลงด้วยเทคนิค PCR ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -387 ถึง +612 (-387/+612) -287 ถึง +612 (-287/+612) และ -34 ถึง +612 (-34/+612) (รูปที่ 3.16, Lane 10-12) จากนั้นทำการโคลนเข้าเวกเตอร์ pGL3 basic (Promega) เพื่อสร้างพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ p(-387/+612) p(-287/+612) และ p(-34/+612) จากนั้นนำพลาสมิดรีคอมบิแนนท์เข้าสู่เซลล์ S2 เพื่อตรวจวัดความสามารถในการทำงานของโปรโมเตอร์ พบว่าที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -287 ถึง -209 น่าจะมีตัวกระตุ้นการแสดงออกของยีน (Activator) มาควบคุมการแสดงออกของยีน *PmVRP15* เพราะหลังจากตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงนี้ออกไป พบว่าจะความสามารถในการทำงานของโปรโมเตอร์ลดลงประมาณ 40 % (รูปที่ 3.19) จากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -525 ถึง -427 และ -287 ถึง -209 เป็นบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน โดยคาดว่าจะมีตัวกดการแสดงออกของยีน (Repressor) และ ตัวกระตุ้นการแสดงออกของยีน (Activator) มาควบคุมการแสดงออกของยีน *PmVRP15* ตามลำดับ



รูปที่ 3.16 แสดงผลการเพิ่มจำนวนของผลิตภัณฑ์ PCR ของ 5' flanking promoter ของยีน *PmVRP15* ด้วยเทคนิค PCR เพื่อนำไปตรวจหาบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน *PmVRP15* ประกอบด้วยรายละเอียดดังนี้

Lane M คือ DNA marker

Lane 1 คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -2047 ถึง +612

Lane 2 คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -1621 ถึง +612

Lane 3 คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -1147 ถึง +612

Lane 4 คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -907 ถึง +612

Lane 5 คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -727 ถึง +612

Lane 6 คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -525 ถึง +612

Lane 7 คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -427 ถึง +612

Lane 8 คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -387 ถึง +612

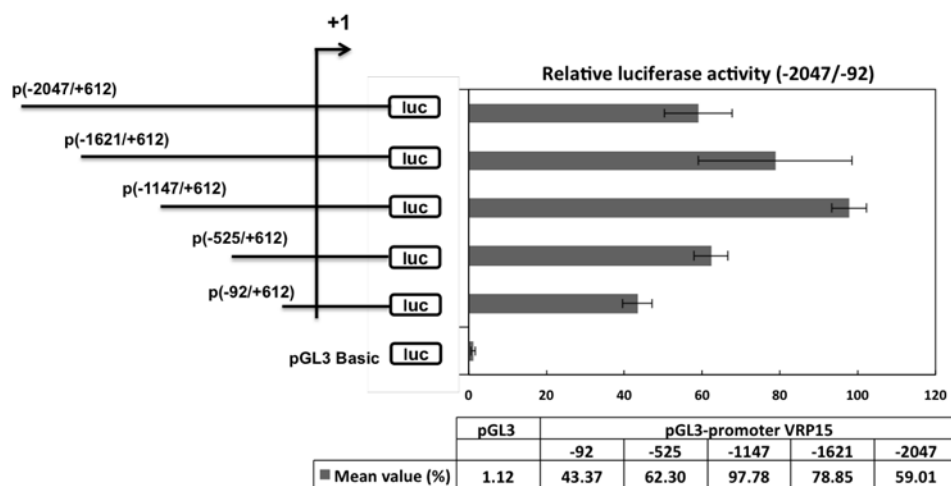
Lane 9 คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -287 ถึง +612

Lane 10 คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -208 ถึง +612

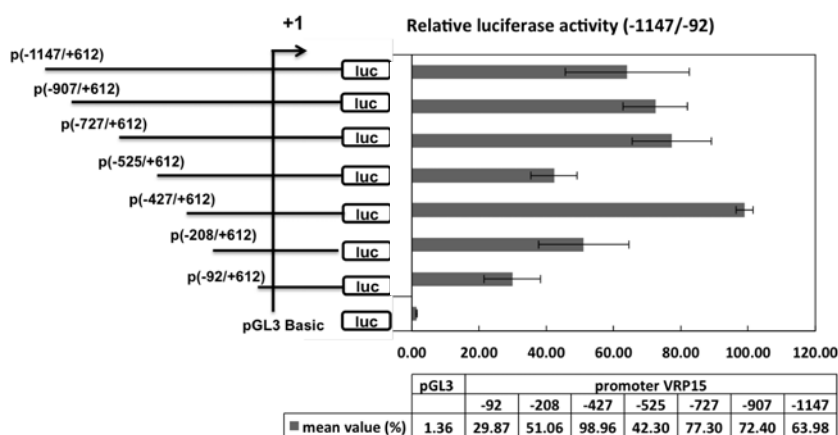
Lane 11 คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -92 ถึง +612

Lane 12 คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -34 ถึง +612

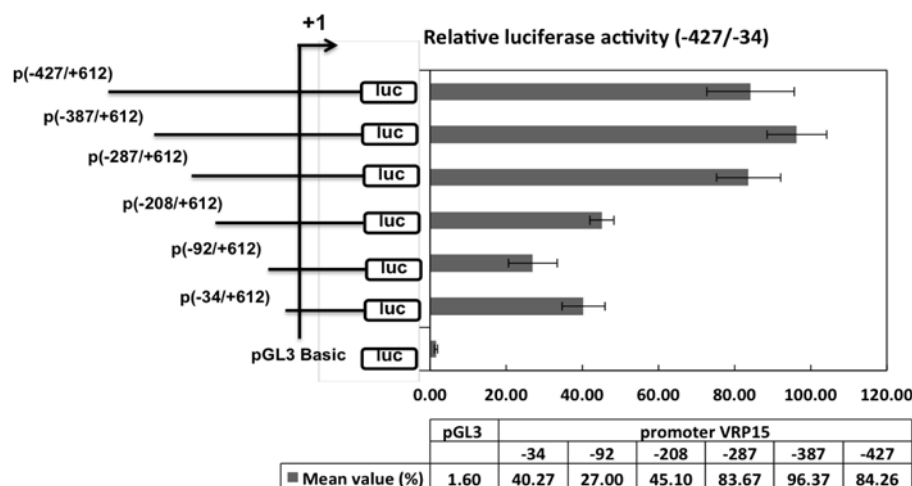
Lane 13 คือ เวกเตอร์ pGL3-basic (Promega)



รูปที่ 3.17 แสดงความสามารถในการทำงานของโปรโมเตอร์ของยีน *PmVRP15* จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -2047 ถึง -92



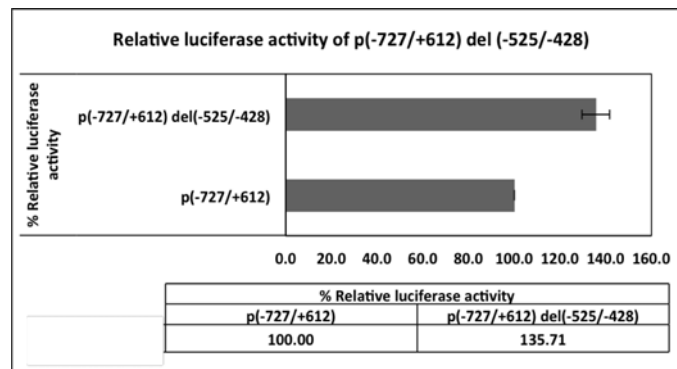
รูปที่ 3.18 แสดงความสามารถในการทำงานของโปรโมเตอร์ของยีน *PmVRP15* จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -1147 ถึง -92



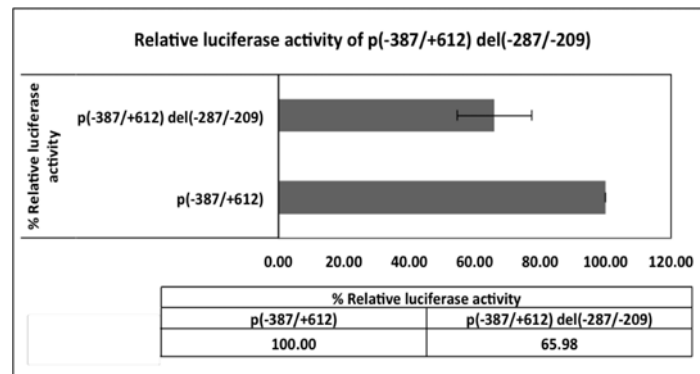
รูปที่ 3.19 แสดงความสามารถในการทำงานของโปรโมเตอร์ของยีน *PmVRP15* จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -427 ถึง -34

3.2.3 ยีนยับยั้งบริเวณด้านปลาย 5' ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน *PmVRP15* ด้วยเทคนิค Deletion mutagenesis

จากผลการศึกษาบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน *PmVRP15* พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -525 ถึง -427 และ -287 ถึง -209 เป็นบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน โดยคาดว่าจะมีตัวกดการแสดงออกของยีน (Repressor) และ ตัวกระตุ้นการแสดงออกของยีน (Activator) มาควบคุมการแสดงออกของยีน *PmVRP15* ตามลำดับ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการยืนยันว่าบริเวณดังกล่าวเป็นบริเวณควบคุมการแสดงออกของยีน จากผลการทดลองหลังจากตัดส่วนของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -525 ถึง -427 ออก (Mutant: p(-727/+612)del(-525/-428)) ความสามารถในการทำงานของโปรโมเตอร์เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ Wildtype: p(-727/+612) (รูปที่ 3.20) และ หลังจากตัดส่วนของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -287 ถึง -209 (Mutant: p(-387/+612)del(-287/-209)) ออก ความสามารถในการทำงานของโปรโมเตอร์ลดลงเมื่อเทียบกับ Wildtype: p(-387/+612) (รูปที่ 3.21) จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -525 ถึง -427 มีตัวกดการแสดงออกของยีน (Repressor) มาควบคุมการแสดงออกของยีน *PmVRP15* และที่บริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -287 ถึง -209 มีตัวกระตุ้นการแสดงออกของยีน (Activator) มาควบคุมการแสดงออกของยีน *PmVRP15*



รูปที่ 3.20 แสดงผลการยืนยันบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -525 ถึง -427 ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน *PmVRP15* ว่าเป็นบริเวณจับของตัวยับยั้งการแสดงออกของยีน (Repressor) โดยทำการเปรียบเทียบความสามารถในการทำงานของโปรโมเตอร์หลังจากตัดส่วนของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -525 ถึง -427 ออก (Mutant: p(-727/+612)del(-525/-428)) เทียบกับความสามารถในการทำงานของโปรโมเตอร์ Wildtype: p(-727/+612)

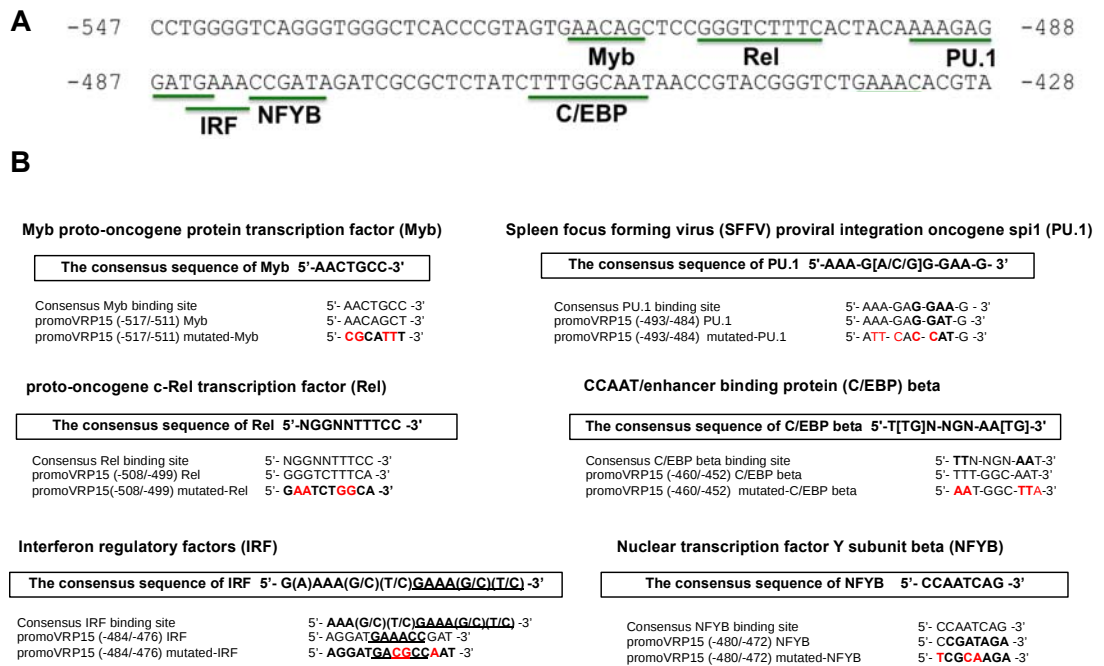


รูปที่ 3.21 แสดงผลการยืนยันบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -287 ถึง -209 ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน *PmVRP15* ว่าเป็นบริเวณจับของตัวกระตุ้นการแสดงออกของยีน (Activator) โดยทำการเปรียบเทียบความสามารถในการทำงานของโปรโมเตอร์หลังจากตัดส่วนของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -287 ถึง -209 ออก (Mutant: p(-387/+612)del(-287/-209)) เทียบกับความสามารถในการทำงานของโปรโมเตอร์ Wildtype: p(-387/+612)

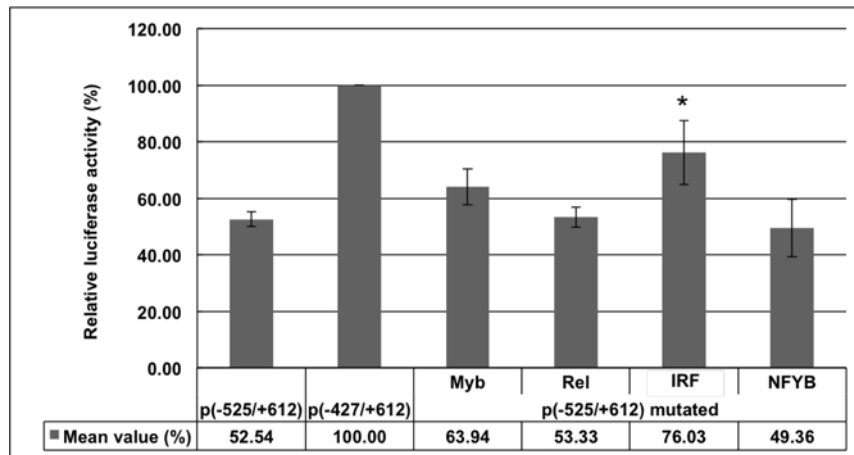
3.2.4 ตรวจหาบริเวณจำเพาะของ transcription factor ที่สามารถจับบริเวณด้านปลาย 5' ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน *PmVRP15* ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

นำส่วนโปรโมเตอร์ของยีน *PmVRP15* ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -525 ถึง -427 และ -287 ถึง -209 มาตรวจสอบหาบริเวณจำเพาะของ transcription factor ที่สามารถจับบนโปรโมเตอร์ส่วนนั้นๆได้ (Transcription factor binding site) จากผลการทดลองพบว่าที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -525 ถึง -427 พบ Transcription factor binding site 6 บริเวณ ได้แก่ Myb proto-oncogene protein transcription factor (Myb) ที่ตำแหน่ง (-517/-511) proto-oncogene c-Rel transcription factor (Rel) ที่ตำแหน่ง (-508/-499) Spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene spi1 (PU.1) ที่ตำแหน่ง (-493/-484) Interferon regulatory factors (IRF) ที่ตำแหน่ง (-484/-476) Nuclear transcription factor Y subunit beta (NFYB) ที่

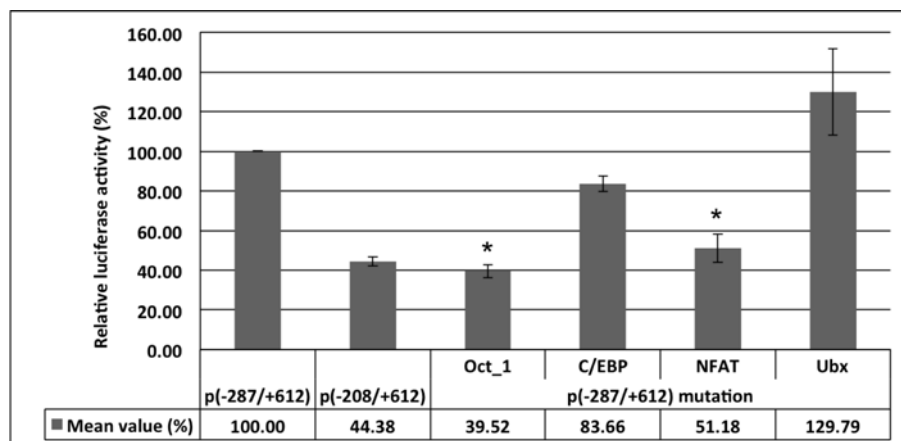
ตำแหน่ง (-480/-472) และ CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) ที่ตำแหน่ง (-460/-452) (รูปที่ 3.22) ในส่วนของบริเวณโปรโมเตอร์ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -287 ถึง -209 พบ Transcription factor binding site 4 บริเวณ ได้แก่ Octamer transcription factor binding site 1 (Oct-1) ที่ตำแหน่ง (-275/-268) CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) ที่ตำแหน่ง (-268/-260) Nuclear factor of activated T-cells transcription factor (NFAT) ที่ตำแหน่ง (-229/-224) และ Ultrabithorax (Ubx) ที่ตำแหน่ง (-257/-252) (รูปที่ 3.23)



รูปที่ 3.22 ลำดับนิวคลีโอไทด์และตำแหน่งที่ทำ Site-directed mutagenesis ของโปรโมเตอร์ของยีน *PmVRP15* บริเวณ -523 ถึง -427 (A) แสดงบริเวณของ Transcription factor binding site ที่สามารถตรวจหาได้บนช่วงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -525 ถึง -427 ที่อยู่บนโปรโมเตอร์ของยีน *PmVRP15* และ (B) แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกทำให้เปลี่ยนแปลงไปเพื่อตรวจหา Transcription factor ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน *PmVRP15*



รูปที่ 3.24 แสดงผลความสามารถในการทำงานของโปรโมเตอร์หลังจากทำการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ บางส่วนบน Transcription factor binding site (Site-directed mutagenesis) บนโปรโมเตอร์ของยีน *PmVRP15* บนช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -525 ถึง -428

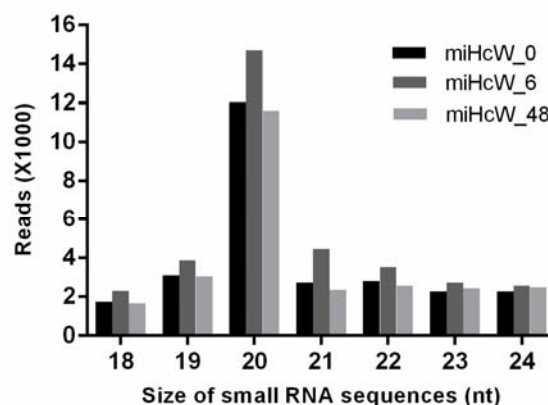


รูปที่ 3.25 แสดงผลความสามารถในการทำงานของโปรโมเตอร์หลังจากทำการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ บางส่วนบน Transcription factor binding site (Site-directed mutagenesis) บนโปรโมเตอร์ของยีน *PmVRP15* บนช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -287 ถึง -209

3.3 ระบุชนิดของ miRNAs และ mRNA เป้าหมายจากกึ่งกลาดำที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

3.3.1 ระบุชนิดของ miRNAs จากกึ่งกลาดำที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

จากการทำ Next generation sequencing เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์จาก small RNA library ของเซลล์เม็ดเลือดของกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เวลา 0 6 และ 48 ชั่วโมง ได้แก่ miHcW_0 miHcW_6 และ miHcW_48 พบว่าแต่ละ library มีจำนวน read เท่ากับ 157,026 196,468 และ 107,556 reads ตามลำดับ และเมื่อข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ของ adapter ออก จำนวน read ของแต่ละ library เหลือเท่ากับ 27,013 34,179 และ 26,209 reads ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลพบว่า small RNA ที่ได้มีขนาด 19-21 นิวคลีโอไทด์ (รูปที่ 3.27) นำข้อมูลมาวิเคราะห์โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่า small RNA ส่วนใหญ่เป็น contaminated RNA จำนวน miRNA homolog ที่พบใน library miHcW_0 miHcW_6 และ miHcW_48 และจำนวน unknown small RNA แสดงในตารางที่ 3.1 โดย miRNA homolog ที่พบใน small RNA library ของเซลล์เม็ดเลือดของกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวมีทั้งหมด 46 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 3.2



รูปที่ 3.26 กราฟแสดงขนาดของ small RNA ของเซลล์เม็ดเลือดของกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เวลา 0 6 และ 48 ชั่วโมงหลังการฉีดเชื้อ หลังจากการตัดบริเวณ 5' และ 3' Adapter

ตารางที่ 3.1 จำนวน miRNA ที่ได้จาก small RNA library ของเซลล์เม็ดเลือดของกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เวลา 0 6 และ 48 ชั่วโมงหลังการฉีดเชื้อ

Type	Number of reads		
	miHcW_0	miHcW_6	miHcW_48
Total reads	157026	196468	107556
Trimmed 3' and 5' adapter	27013	34179	26209
Contamination RNA	25611	32147	25193
microRNA homolog	596	1040	118
Unknown small RNA	809	992	898

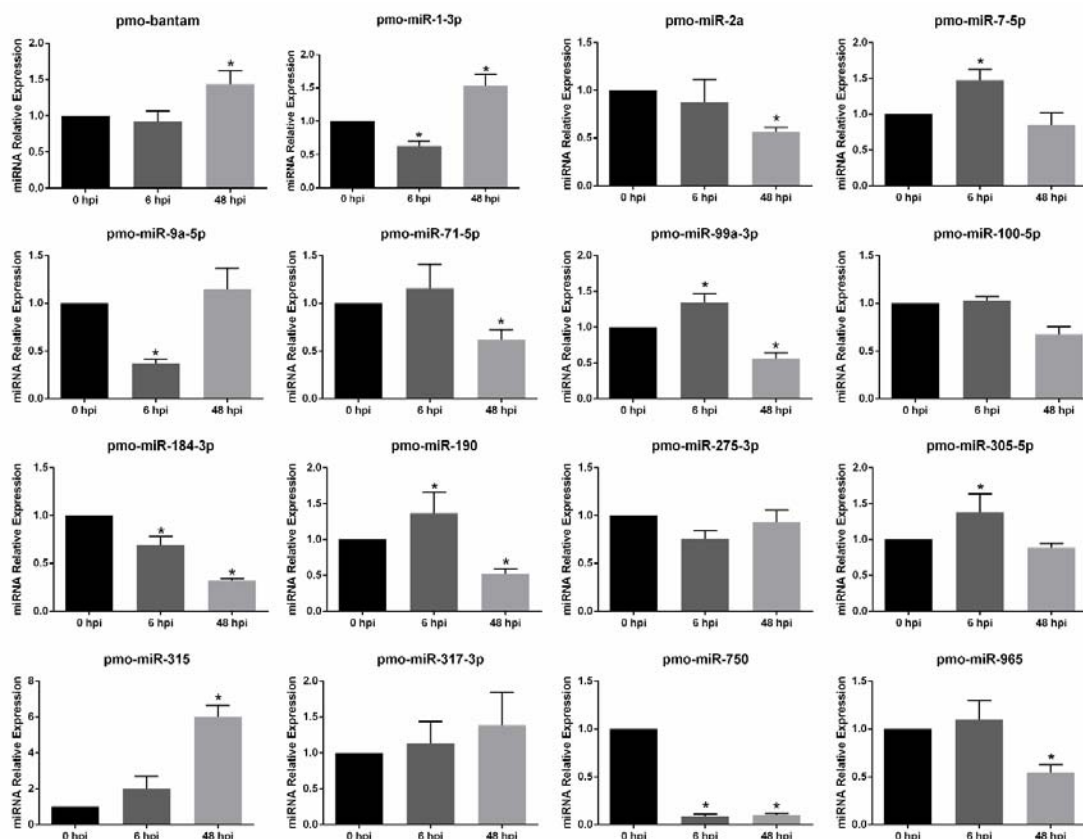
ตารางที่ 3.2 ลำดับและขนาดของนิวคลีโอไทด์ของ miRNA จากเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลูตาต้าที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

No	miRNA name	Sequence	Length (nt)	No	miRNA name	Sequence	Length (nt)
1	pmo-bantam	TGAGATCATTGTGAAAGCTG	20	24	pmo-miR-2b	TATCACAGCCACCTTTGATGA	21
2	pmo-let-7-3p	CTGTACAACCTTGCTAACTTTC	21	25	pmo-miR-305-5p	ATTGTACTTCATCAGGTGC	19
3	pmo-let-7-5p	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTTTT	24	26	pmo-miR-307a-3p	TCACAACCTCCTTGAGTGAG	20
4	pmo-miR-1000-5p	ATATTGTCCCGTCACAGCAGT	21	27	pmo-miR-315	TTTTGATTGTTGCTCAGAAG	20
5	pmo-miR-100-5p	AACCCGTAGATCCGAACCTG	20	28	pmo-miR-316	TGTCTTTTTCTGCTTTGCTGCCG	23
6	pmo-miR-12-5p	TGAGTATTACATCAGGTACTGG	22	29	pmo-miR-317-3p	TGAACACAGCTGGTGGTATCCC	22
7	pmo-miR-1260	CGAATCCCACCGCTGCCACC	20	30	pmo-miR-33a-5p	ATGCATTGTAGTTGCATTG	19
8	pmo-miR-1-3p	TGGAATGTAAAGAAGTATGG	20	31	pmo-miR-34-5p	TGGCAGTGTGGTTAGCTGGTTG	22
9	pmo-miR-184-3p	TGGACGGAGAAGTATAAGGGT	22	32	pmo-miR-6490	CGACCTCGAGTGGAGGGA	18
10	pmo-miR-190-5p	AGATATGTTTGATATTCTTGGT	22	33	pmo-miR-6493-3p	AGGGGGAAACCGCGCTGAGC	20
11	pmo-miR-193-3p	TACTGGCCTGCTAAGTCCC	19	34	pmo-miR-6493-5p	CGTCCGGCAGGTTTTACCCC	20
12	pmo-miR-2001	TTGTGACCGTTATAATGGGC	20	35	pmo-miR-71-3p	ATCTCACTACCTTGTCTTTC	20
13	pmo-miR-252-5p	CTAAGTACTAGTGCCGCAGGA	21	36	pmo-miR-71-5p	TGAAAGACATGGGTAGTGA	19
14	pmo-miR-263a-5p	AATGGCACTGGAAGAATTACAG	22	37	pmo-miR-750	CCAGATCTAACTCTTCCAGC	20
15	pmo-miR-275-3p	TCAGGTACCTGATGTAGC	18	38	pmo-miR-7-5p	TGGAAGACTAGTGATTTTGTG	22
16	pmo-miR-2765	TTGGTAACTCCACCACCGTTG	21	39	pmo-miR-8-5p	CATCTTACCGACAGCATT	20
17	pmo-miR-276a-3p	TAGGAACCTTCATACCGTGCT	20	40	pmo-miR-87-3p	GTGAGCAAAGTTTCAGGTGTG	21
18	pmo-miR-279	TGACTAGATCCACACTCATCC	21	41	pmo-miR-92b-3p	AATTGCACTAGTCCCGCCT	20
19	pmo-miR-281-2-5p	AAGAGAGCTATCCGTCGACA	20	42	pmo-miR-965	TAAGCGTATGGCTTTTCCCC	20
20	pmo-miR-282-5p	TAGCCTCTCCTTGCGCTTTGTC	21	43	pmo-miR-981	TCGTTGTCTGTCGAAACCTG	20
21	pmo-miR-2898	TACCCCGCATCTCCACCATG	20	44	pmo-miR-99a-3p	CAAGCTCGATTCTATGGG	18
22	pmo-miR-2a	CAGCCAGCTTTGATGAGCGT	20	45	pmo-miR-9a-5p	TCTTTGGTGATCTAGCTG	18
23	pmo-miR-2a-3p	TATCACAGCCAGCTTTGATGA	21	46	pmo-miR-9b	ATAAAGCTAGATTACCAAAGC	21

3.3.2 วิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ miRNA ในเม็ดเลือดกึ่งกลูตาต้าที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

การวิเคราะห์การแสดงออกของ miRNA ที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลูตาต้าที่ 0 6 และ 48 ชั่วโมงหลังจากการติดเชื้อ อาศัยเทคนิค stem-loop real-time PCR โดยใช้ U6 เป็น internal control miRNA บางชนิดมีระดับแสดงออกเปลี่ยนแปลงไป และบางชนิดระดับการแสดงออกไม่เปลี่ยนแปลงหลังจากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (รูปที่ 3.27) มี miRNA จำนวน 11 ชนิดจาก 16 ชนิดที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปในเซลล์เม็ดเลือดกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ระดับการแสดงออกของ pmo-miR-7-5p pmo-miR-275-3p pmo-miR-305-5p pmo-miR-317-3p และ pmo-bantam ไม่เปลี่ยนแปลงที่ 6 และ 48 ชั่วโมงหลังจากการติดเชื้อ pmo-miR-9a-5p มีระดับการแสดงออกลดลง 2.69 เท่าที่ 6 ชั่วโมงและที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังจากการติดเชื้อเพิ่มขึ้นมาเท่ากับที่ 0 ชั่วโมง ระดับการแสดงออกของ pmo-miR-2a-3p pmo-miR-71-5p pmo-miR-99a-3p pmo-miR-184-3p pmo-miR-190 และ pmo-miR-965 ไม่เปลี่ยนแปลงที่ 6 ชั่วโมงหลังจากการติดเชื้อ แต่ระดับการแสดงออกลดลงที่ 48 ชั่วโมง 1.76 1.61 1.78 3.12 1.92 และ 1.82 เท่าตามลำดับ สำหรับการแสดงออกของ pmo-miR-100-5p เพิ่มขึ้น 1.67 เท่าที่ 6 ชั่วโมงและลดลง 2.34 เท่าที่ 48 ชั่วโมงหลังจากการติดเชื้อ pmo-miR-1-3p มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้น 1.59 เท่าที่ 6 ชั่วโมงและเพิ่มขึ้น 1.54 เท่าที่ 48 ชั่วโมง ระดับการแสดงออกของ pmo-miR-315 เพิ่มขึ้นที่ 6 และ 48 ชั่วโมง 2.01 และ 5.99 เท่า

ตามลำดับ สำหรับ pmo-miR-750 ระดับการแสดงออกลดลง 11.78 และ 9.63 เท่าที่ 6 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ



รูปที่ 3.27 ระดับการแสดงออกของ miRNA ที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำที่ 0 6 และ 48 ชั่วโมง อาศัยเทคนิค stem-loop real-time PCR โดยสกัด RNA ออกจากเซลล์เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อที่ 0 6 และ 48 ชั่วโมง และใช้เป็นแม่แบบในการสร้าง cDNA โดยใช้ stem-loop primer ที่มีความจำเพาะกับ miRNA ที่สนใจ จากนั้นตรวจสอบการแสดงออกของ miRNA ด้วย primer และ SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad) โดยใช้ cDNA เป็นแม่แบบ บนเครื่อง CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System โดยใช้ U6 เป็น internal control (* หมายถึง $p < 0.05$)

3.3.3 ทำนายเป้าหมายของ miRNA ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันจากกุ้งกุลาดำด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

จากการทำนาย mRNA เป้าหมายของ miRNA ด้วยโปรแกรม miRNA Target Identification-V0.5 และ RNAhybrid โดยใช้ฐานข้อมูล *P. monodon* EST database (In-house database) พบว่า miRNA อาจจะมีสามารถในการควบคุมการแสดงออกของ mRNA เป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้ง ได้แก่ เปปไทด์ต้านจุลชีพ เช่น CrustinPm4 Penaeidin3b Antilipopolysaccharide factor isoform 3 การสื่อสารของเซลล์ เช่น Integrin Serine/threonine-protein kinase โปรตีนฮีตช็อก เช่น Heat shock protein 40 Heat shock protein 70 ระบบโพรพีนอลออกซิเดส เช่น Clip domain serine proteinase 2 Prophenoloxidase-activating enzyme 1a โปรแกรมการตายของเซลล์ เช่น Caspase 2 Apoptosis-inducing factor Beclin-1-like protein

เป็นต้น (ตารางที่ 3.3) จากการทำนายตำแหน่งของ mRNA ที่จับโดย miRNA พบ miRNA สามารถจับได้ทั้ง บริเวณ 5' Untranslated region (5'UTR) 3' Untranslated region (3'UTR) และ Open reading frame (ORF)

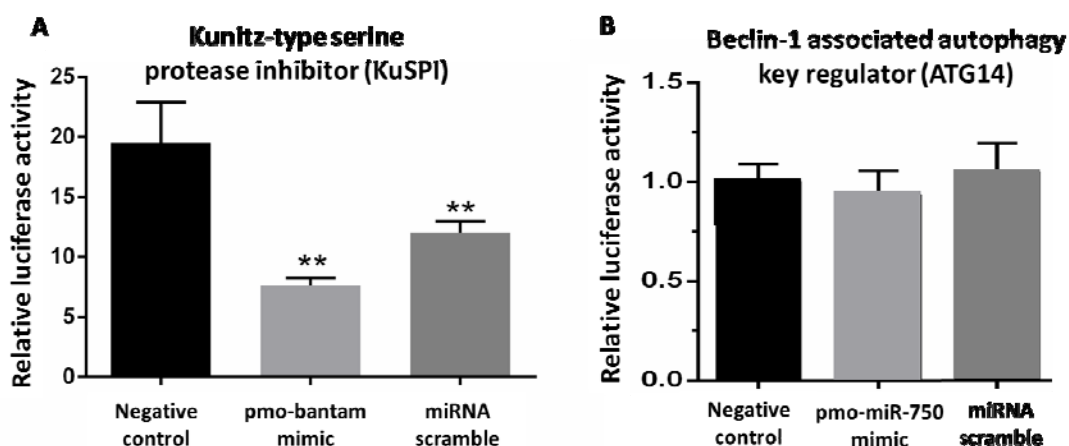
3.3.4 ตรวจสอบการจับกันของ miRNA กับ mRNA เป้าหมายโดยใช้เทคนิค Luciferase activity assay

จากข้อมูลการวิเคราะห์การแสดงออกของ pmo-miR-750 พบว่ามีการแสดงออกลดลงอย่างมาก หลังจากติดเชื้อไวรัสดวงแดงขาว ที่ 6 และ 48 ชั่วโมง เมื่อนำมาทำนาย mRNA เป้าหมาย พบว่าอาจจะควบคุมการแสดงออกของยีน beclin-1 associated autophagy key regulator (ATG14) ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการ Autophagy โดย pmo-miR-750 สามารถจับบริเวณ 3'UTR ของยีน ATG14 สำหรับการทำนาย mRNA เป้าหมายของ pmo-bantam พบว่ามีเป้าหมายหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน เช่น การสื่อสารของเซลล์ โปรตีนส ตัวยับยั้งโปรตีนส โปรแกรมการตายของเซลล์ เป็นต้น ยีนเป้าหมายของ pmo-bantam ที่มีความน่าสนใจ คือ Kunitz-type protease inhibitor (KuSPI) จากการทำนายพบว่า miRNA จับที่บริเวณ 3'UTR ของยีนเป้าหมาย อีกทั้ง pmo-bantam นั้นมีความอนุรักษ์ในสิ่งมีชีวิตต่างๆ ดังนั้นในงานวิจัยนี้สนใจที่จะระบุหน้าที่ของ pmo-miR-750 และ pmo-bantam

จากการวิเคราะห์การจับกันของ pmo-bantam กับยีน KuSPI และ pmo-miR-750 กับยีน ATG14 ด้วยเทคนิค Luciferase activity assay พบว่า pmo-bantam สามารถยับยั้งการแสดงออกของ Luciferase ได้ประมาณ 61% เมื่อเปรียบเทียบกับ Negative control แต่ miRNA scramble ซึ่งเป็น control ก็สามารถยับยั้งการแสดงออกของ Luciferase ได้เช่นกัน (ลดลงประมาณ 38.19%) (รูปที่ 3.28A) ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่า pmo-bantam มีความสามารถในการจับบริเวณของ 3'UTR binding site ของยีน KuSPI ได้ แต่มีความเป็นไปได้ว่าปริมาณ pmo-bantam และ miRNA scramble ที่ใช้มากเกินไป ดังนั้นจะต้องหาสภาวะในการทดลองที่เหมาะสมและทำการทดลองซ้ำต่อไป วิเคราะห์ความสามารถในการจับกันของ pmo-miR-750 กับยีน ATG14 พบว่า pmo-miR-750 ไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของ Luciferase ได้ ดังนั้น pmo-miR-750 ไม่สามารถควบคุมการแสดงออกของยีน ATG14 บริเวณ ORF ได้ (รูปที่ 3.28B)

ตารางที่ 3.3 ทำนาย mRNA เป้าหมายของ miRNA ที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ โดยใช้ฐานข้อมูล EST

Function mRNA target	Target gene	miRNA (Target site)
Antimicrobial peptides	Crustin Pm4 antimicrobial peptide	miR-2a (ORF)
	Penaeidin 3b antimicrobial peptide	miR-6493-5p (5'UTR), miR-981 (ORF, 3'UTR)
	Anti-lipopolysaccharide factor isoform 3	miR-6489-5p (ORF)
	i-type lysozyme-like protein 1	miR-965 (ORF)
Signaling transduction	Integrin	miR-317-3p (ORF), miR-92b-3p (ORF)
	Integrin alpha like	miR-317-3p (ORF), miR-34-5p (ORF)
	Tyrosine-protein kinase	miR-8-5p (3'UTR), miR-981 (ORF)
	Serine/threonine-protein kinase-like	miR-1000-5p (ORF), miR-87-3p (ORF), miR-276a-3p (ORF), miR-33a-5p (ORF), bantam (ORF), miR-9a-5p (ORF), miR-276a-3p (ORF)
	Serine/threonine-protein kinase	miR-981 (ORF), miR-307a-3p (ORF), miR-9a-5p (ORF), miR-9a-5p (5'UTR), miR-6241 (ORF), miR-4448 (3'UTR), miR-2a-3p (3'UTR), miR-315 (5'UTR), miR-276a-3p (ORF), let-7-5p (ORF), miR-305-5p (ORF)
	Serine/threonine-protein phosphatase	miR-2001 (3'UTR), bantam (ORF, 3'UTR), miR-2a-3p (3'UTR)
	cAMP-dependent protein kinase	miR-275-3p (ORF)
Heat shock proteins	Heat shock protein	miR-9a-5p (ORF)
	Heat shock protein 40	miR-71-5p (3'UTR)
	Heat shock protein 67B2	miR-317-3p (ORF), miR-6244 (ORF), miR-965 (ORF)
	Heat shock protein 70	miR-9a-5p (ORF)
	DnaJ homolog dnj-2 precursor	miR-282-5p
Oxidative stress	Thioredoxin	miR-71-3p (ORF)
	Thioredoxin domain-containing protein-like	miR-2373-3p (ORF), miR-2a-3p (3'UTR), miR-2b
	Glutathione peroxidase	miR-6244 (ORF)
	Copper/zinc superoxide dismutase	miR-33a-5p (5'UTR)
Proteinase/proteinase inhibitor	Serine proteinase inhibitor 7	miR-184-5p (ORF), miR-9a-5p (ORF)
	Kunitz-type serine protease inhibitor	bantam (3'UTR), miR-307a-3p (ORF), miR-276a-3p
	Serine proteinase	bantam (ORF), miR-92b-3p (ORF), miR-316 (ORF), miR-1032 (ORF), miR-316 (ORF)
	Cathepsin C	miR-275-3p (ORF)
	Cathepsin D	miR-1260 (ORF), miR-307a-3p (ORF)
Blood clotting system	Proclotting enzyme	miR-2a (ORF), miR-2a-3p (ORF), miR-2b (ORF)
Apoptotic tumor-related protein	Cell death protein	miR-307a-3p (ORF), miR-1000-5p (ORF), miR-184-5p (5'UTR)
	Caspase 2	miR-9a-5p (ORF)
	Apoptosis regulatory protein Siva	let-7-3p (ORF)
	Apoptosis-inducing factor	bantam (ORF), miR-2001 (ORF)
	Apoptotic chromatin condensation inducer	miR-316 (ORF), miR-9a-5p (ORF)
	Inhibitor of apoptosis protein	miR-6489-5p (ORF)
	Autophagy-related protein 2-like protein	miR-275-3p (ORF), miR-92b-3p (ORF), miR-9a-5p (5'UTR)
	Beclin 1-associated autophagy-related key regulator	miR-750 (ORF), miR-9a-5p (ORF)
ProPO system	Beclin-1-like protein	miR-307a-3p (ORF, 3'UTR), miR-1032 (ORF)
	Clip domain serine proteinase 2	miR-2a (3'UTR), miR-1260 (ORF)
Pattern recognition	Prophenoloxidase-activating enzyme 1a	miR-315 (5'UTR)
	C-type lectin 1	miR-2b (ORF)
Other immune molecules	Chitinase	miR-2898 (ORF)
	Cadherin	miR-2a (ORF), miR-981 (ORF), miR-2001 (ORF), miR-275-3p (ORF), miR-9161 (ORF)
	Cadherin-like	miR-981 (ORF)
	Alpha2 macroglobulin	miR-6237 (ORF)



รูปที่ 3.28 วิเคราะห์ยับยั้งการแสดงออกของยีนเป้าหมาย KuSPI ของ pmo-bantam และ ATG14 ของ pmo-miR-750 โดย co-transfect พลาสมิดรีคอมบิแนนท์ 200 ng pmirGLO-KuSPI กับ 20 pmol pmo-bantam mimic (A) หรือ 200 ng pmirGLO-ATG14 กับ 20 pmol pmo-miR-750 mimic (B) เข้าสู่เซลล์ HEK293-T เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่าแอกทิวิตีของ firefly luciferase และ Renilla luciferase และนำมาคำนวณค่าแอกทิวิตีสัมพัทธ์ที่ได้จากการเปรียบเทียบค่าแอกทิวิตีของ firefly luciferase ที่ normalize ด้วย Renilla luciferase (** หมายถึง $p < 0.01$)

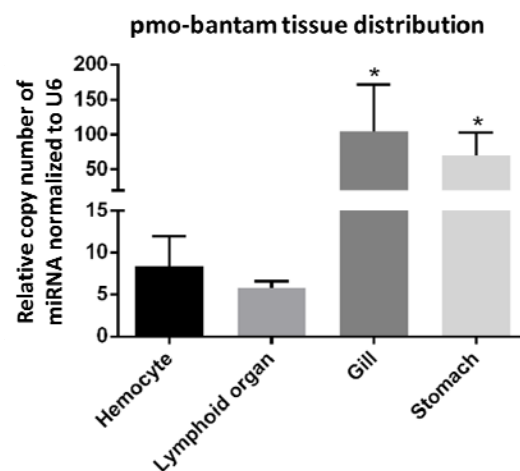
3.3.5 ระดับการแสดงออก miRNA และ mRNA เป้าหมายในเนื้อเยื่อชนิดต่างๆของกิ้งกูดำต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

จากการศึกษาความสามารถในการจับกันของ miRNA กับ mRNA เป้าหมาย พบว่า pmo-bantam สามารถจับกับยีน KuSPI ได้ จึงตรวจสอบการแสดงออกของ pmo-bantam และ KuSPI ในเนื้อเยื่อชนิดต่างๆที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกิ้งกูดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว พบว่าระดับการแสดงออก pmo-bantam นั้นมีการแสดงออกมากที่สุดที่เหงือก เนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร เซลล์เม็ดเลือด และอวัยวะน้ำเหลืองตามลำดับ (รูปที่ 3.29)

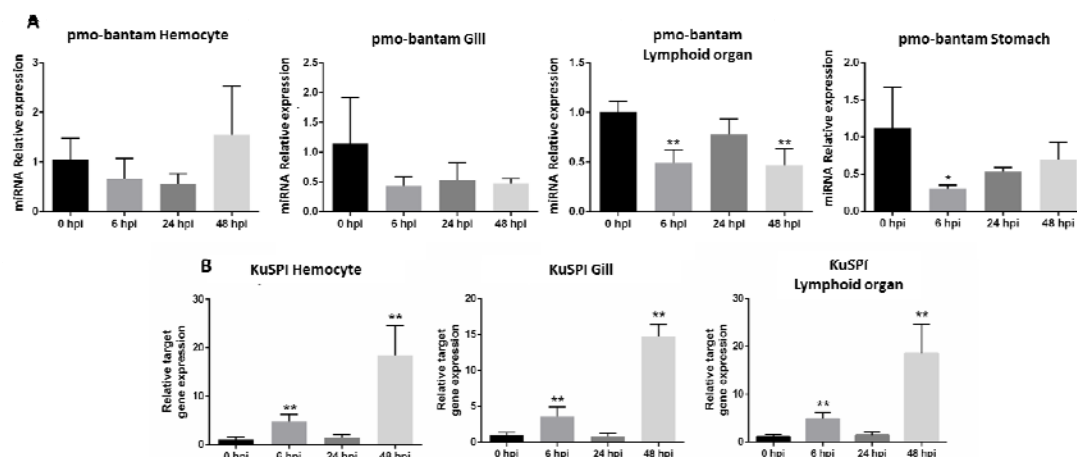
ในกิ้งกูดำติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ 0 6 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าระดับการแสดงออกของ pmo-bantam ในอวัยวะน้ำเหลืองลดลงที่ 6 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อประมาณ 2 เท่า จากนั้นระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นที่ 24 ชั่วโมง และลดลงอีกที่ 48 ชั่วโมงหลังจากการติดเชื้อประมาณ 2 เท่า ในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร ระดับการแสดงออกของ pmo-bantam ลดลงที่ 6 ชั่วโมงหลังจากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว สำหรับเซลล์เม็ดเลือดและเหงือก ระดับการแสดงออกของ pmo-bantam ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อมีการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (รูปที่ 3.30A) จากนั้นวิเคราะห์ระดับการแสดงออกยีนเป้าหมายของ pmo-bantam พบว่าระดับการแสดงออกของ KuSPI ในเซลล์เม็ดเลือด เหงือก และอวัยวะน้ำเหลือง เพิ่มขึ้นที่ 6 ชั่วโมง และลดลงที่ 24 ชั่วโมงหลังจากการติดเชื้อ เมื่อกิ้งกูดำติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ 48 ชั่วโมง KuSPI มีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นในเนื้อเยื่อทั้ง 3 ชนิด เซลล์เม็ดเลือด เหงือก และอวัยวะน้ำเหลือง ประมาณ 15-20 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับที่ 0 ชั่วโมง (รูปที่ 3.30B)

จากการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของ pmo-bantam และยีนเป้าหมาย KuSPI ในอวัยวะน้ำเหลืองที่ 6 ชั่วโมงหลังจากการติดเชื้อ พบว่าการแสดงออกมีความสอดคล้องกันคือ pmo-bantam มีการ

แสดงออกลดลงในขณะที่ยีน KuSPI มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น หลังจากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ 24 ชั่วโมง ระดับการแสดงออก pmo-bantam เพิ่มขึ้น ในทางกลับกันยีน KuSPI มีการแสดงออกลดลง และที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังจากการติดเชื้อ pmo-bantam มีระดับการแสดงออกลดลง ส่วนยีน KuSPI มีระดับการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้น ดังสรุปได้ว่า pmo-bantam น่าจะควบคุมการแสดงออกของยีน KuSPI ในอวัยวะน้ำเหลืองของกุ้ง กูลาดำได้ เมื่อติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว แต่สำหรับเซลล์เม็ดเลือด และเหงือกการแสดงออกของ pmo-bantam และ KuSPI ไม่สอดคล้องกัน ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากระดับการแสดงออกของยีน KuSPI อาจถูกควบคุมโดยกระบวนการอื่นในสิ่งมีชีวิตที่นอกเหนือจากระบบ RNAi จึงทำให้ระดับการแสดงออกของ pmo-bantam ไม่สอดคล้องกับการแสดงออกของยีนเป้าหมาย



รูปที่ 3.29 การแสดงออกของ pmo-bantam ที่ normalized ด้วย U6 ในเนื้อเยื่อต่างๆ ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือด อวัยวะน้ำเหลือง เหงือก และ เนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร ด้วยเทคนิค stem-loop quantitative RT-PCR (* หมายถึง $p < 0.05$)



รูปที่ 3.30 การแสดงออกของ pmo-bantam ด้วยเทคนิค stem-loop quantitative RT-PCR (A) และยีน KuSPI ด้วยเทคนิค quantitative RT-PCR (B) ของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เวลา 0 6 24 และ 48 ชั่วโมง ในเซลล์เม็ดเลือด อวัยวะน้ำเหลือง เหงือก และเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร (* หมายถึง $p < 0.05$ ** หมายถึง $p < 0.01$)

4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากงานวิจัยที่ผ่านมา (Vatanavicharn et al. 2014) ได้มีการตรวจพบยีนใหม่คือยีน Viral Responsive Protein 15 (*PmVRP15*) ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกมากในกิ่งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว จึงนำมาตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างยีน *PmVRP15* และเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ด้วยเทคนิค RNA interference พบว่าเมื่อทำการยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmVRP15* ในกิ่งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ยีนของไวรัส *ie-1* (แสดงออกในระยะติดเชื้อ immediate early) WSV477 (แสดงออกในระยะติดเชื้อ early) และ *vp28* (แสดงออกในระยะติดเชื้อ late) มีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อตรวจสอบอัตราการตายของกิ่ง พบว่าในกิ่งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmVRP15* มีอัตราการตายลดลง ทำให้กิ่งที่ติดเชื้อตายช้าลง จากผลการทดลองในส่วนนี้ทำให้สามารถสรุปได้ว่า ยีน *PmVRP15* มีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนไวรัสตัวแดงดวงขาวในกิ่งกุลาดำ แต่จากผลการทดลองนี้ ก็ยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่ชัด จึงใช้เทคนิค yeast two-hybrid screening เพื่อหาโปรตีนที่สามารถจับกับ *PmVRP15* ได้ ซึ่งอาจจะช่วยทำให้ทราบหน้าที่การทำงานของ *PmVRP15* จากผลการทดลองพบว่า โปรตีน *PmVRP15* ในส่วนปลาย N สามารถจับกับโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาว WSV399 และได้ทำการยืนยันผลการจับกันด้วยเทคนิค co-immunoprecipitation พบว่าโปรตีนทั้งสองสามารถจับกันได้จริง ในส่วนของโปรตีน WSV399 เป็นโปรตีนไวรัสที่ยังไม่มีการศึกษาเช่นกัน จึงเริ่มทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน WSV399 ในเมดเลือดกิ่งกุลาดำที่ติดเชื้อ พบว่ามีการแสดงออกหลังจากกิ่งติดเชื้อไวรัส 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเดียวกับการแสดงออกของยีน VP28 ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกในกิ่งที่ติดเชื้อไวรัสที่ระยะ late ทำให้สรุปได้ว่ายีน WSV399 มีการแสดงออกในระยะ late หลังกิ่งติดเชื้อไวรัส โดยส่วนมากยีนที่แสดงออกในระยะ late จะเป็นโปรตีนโครงสร้างของไวรัส เช่นโปรตีน VP28 ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบมากในโครงสร้างส่วน envelope จากนั้นทำการศึกษาระดับการแสดงออกของโปรตีน WSV399 ในไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยนำไวรัสที่ทำให้บริสุทธิ์มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค western blot โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน WSV399 พบว่าเป็นโปรตีนโครงสร้าง WSV399 ที่พบได้ทั้งในส่วนของ envelope และ nucleocapsid ซึ่งคาดว่า WSV399 อยู่ในส่วน Tagument ของไวรัสเหมือนกับโปรตีน VP26 ของไวรัสตัวแดงดวงขาว ที่เป็นโปรตีนโครงสร้างส่วนของ tegument (Tsai et al. 2006) ซึ่งตรวจพบการแสดงออกทั้งใน envelope และ nucleocapsid จากนั้นยืนยันผลด้วยเทคนิค immunoelectron microscopy จากนั้นทำการศึกษาน้ำที่ของ WSV399 ในการเพิ่มจำนวนไวรัสในกิ่งด้วยเทคนิค RNA interference เมื่อทำการยับยั้งการแสดงออกของยีน WSV399 ในกิ่งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวพบว่ายีนของไวรัสมีการแสดงออกของยีนไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่เมื่อทำการตรวจสอบอัตราการตายของกิ่ง พบว่าลดลงหลังจากยับยั้งการแสดงออกของยีน WSV399 จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าโปรตีน WSV399 น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของไวรัสในกิ่ง ได้มีการรายงานผลการวิจัยเกี่ยวกับหน้าที่ของโปรตีนไวรัสส่วน tegument ยกตัวอย่างเช่น ในไวรัส HSV1 (Herpes Simplex Virus type 1) มีการศึกษาโปรตีน tegument หลายตัว พบว่าทำหน้าที่เกี่ยวกับการขนส่งไวรัสเข้าและออกจากเซลล์ (viral trafficking) การพาไวรัสจาก cytoplasm เข้าสู่ nucleus (targeting of the capsid to the nucleus) และการประกอบเป็นตัวสมบูรณ์ของไวรัส (viral assembly) (Kelly et al. 2009) ซึ่งโปรตีนไวรัสส่วนของ tegument เมื่อทำการขนส่งไวรัสเข้าหรือออกจากเซลล์ ต้องอาศัยโปรตีนในกลุ่มของโปรตีนโครงสร้าง (cytoskeleton) ในการขนส่ง (Lyman and Enquist 2009) ในไวรัสตัวแดงดวงขาวได้มีการรายงานว่าโปรตีน VP26 เป็นโปรตีนที่พบมากในไวรัสส่วน tegument สามารถจับกับ β -actin ของกิ่งได้ (Xie and Yang 2005)

ในส่วนของโปรตีน *PmVRP15* ที่พบว่าการแสดงออกอยู่บริเวณ nuclear membrane ของเซลล์เม็ดเลือด (Vatanavicharn et al. 2014) และยังมีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของไวรัสในกึ่ง เมื่อคิดวิเคราะห์จากผลการทดลองที่ได้กับรายงานการวิจัยที่ผ่านมาจึงคาดว่าโปรตีน WSV399 และโปรตีน *PmVRP15* อาจทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการขนส่งไวรัสเข้าออกเซลล์ และช่วยในส่วนของการประกอบเป็นตัวสมบูรณ์ของไวรัส ซึ่งในส่วนนี้จะต้องทำการทดลองเพื่อพิสูจน์ต่อไป

จากที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นว่ายีน *PmVRP15* มีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นในกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว เมื่อเทียบกับกึ่งปกติ ซึ่งเพิ่มมากขึ้นถึง 9,000 เท่า (Vatanavicharn et al. 2014) ทำให้สนใจศึกษาการควบคุมการแสดงออกของยีน *PmVRP15* เริ่มจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PmVRP15* ด้วยเทคนิค genome organization พบว่ายีน *PmVRP15* ประกอบด้วย exon 4 ส่วนและ intron 3 ส่วน จากนั้นทำ genome walking เพื่อหาบริเวณที่ควบคุมการแสดงออกของยีนด้านปลาย 5' พบว่ามีขนาดประมาณ 2 กิโลเบส จากนั้นตรวจหาบริเวณสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน จากผลการทดลองพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ -525 ถึง -428 และบริเวณ -287 ถึง -209 มีความสำคัญต่อการแสดงออกของยีน โดยคาดว่าเป็นบริเวณที่ถูกควบคุมด้วย repressor และ activator ตามลำดับ เมื่อนำไปทำนาย transcription factor binding site และตรวจหาตำแหน่งสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค site-directed mutagenesis เพื่อหาว่าบริเวณนั้นๆถูกควบคุมด้วย transcription factor ตัวใด จากผลการทดลองพบว่า interferon regulatory factor (IRF) น่าจะเป็น repressor และ Octamer transcription factor 1 (Oct-1) กับ Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) น่าจะเป็น activator ที่เข้ามาควบคุมการแสดงออกของยีน *PmVRP15* ในส่วนของ IRF จากผลงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า IRF มีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการติดเชื้อของไวรัส โดยจะเข้าไปควบคุมระบบการตอบสนองต่อการติดเชื้อของเจ้าบ้านโดยเข้าไปควบคุมให้มีการผลิต interferon และไวรัสบางชนิดเช่น ไวรัส Kaposi's sarcoma-associated herpes virus (KSHV) สามารถผลิต IRF (vIRF) เพื่อเข้ามาควบคุมการแสดงออกของยีนในเจ้าบ้านได้เช่นกัน (Taniguchi et al. 2001) นอกจากการควบคุมการแสดงออกของยีน interferon ยังมีรายงานว่า vIRF สามารถทำหน้าที่ในการยับยั้งการกระตุ้นให้เกิด program cell death ในเจ้าบ้านได้อีกด้วย (Kirchhoff et al. 2002) ในส่วนของ Oct-1 มีผลงานวิจัยมากมายที่กล่าวว่า Oct-1 เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัส ยกตัวอย่างเช่น เกี่ยวข้องกับกระบวนการประกอบเป็นตัวสมบูรณ์ (viral assembly) ของไวรัส HSV (Nogueira et al. 2004) ในส่วนของ NFAT จะมีหน้าที่หลักเกี่ยวข้องกับระบบ calcium signaling (Hogan et al. 2003) แต่ที่พบว่าโปรตีนที่ถูกควบคุมด้วย NFAT ยังทำงานเกี่ยวข้องระบบอื่นๆด้วย โดยมีรายงานว่า NFAT มีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันคือเป็นตัวกระตุ้นให้เกิด program cell death ได้ (Macian 2005) ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่า NFAT ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อของไวรัส Simian Virus 40 (SV40) คือเมื่อยับยั้งการแสดงออกของ NFAT แล้วทำให้มีปริมาณไวรัสในเซลล์ลดลง ทำให้เห็นว่า NFAT มีผลต่อกระบวนการ transcription ของยีนไวรัส (Manley et al. 2008) จากผลการทดลองและการวิเคราะห์ผลที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน *PmVRP15* ทำให้ทราบถึงโปรตีนต่างๆและบริเวณที่เกี่ยวข้องที่ทำหน้าที่ในการควบคุมยีนนี้ แต่ยังคงต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลการทดลองต่อไป

การระบุ miRNA ของกึ่งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยเทคนิค Next generation sequencing พบ miRNA homolog จำนวน 46 ชนิด ซึ่งมี 4 miRNAs ที่มีความอนุรักษ์มากในสิ่งมีชีวิตอื่น ได้แก่ pmo-miR-1-3p pmo-miR-263a-5p pmo-miR-34-5p และ pmo-miR-8-5p สามารถพบได้ใน *Drosophila melanogaster* (fruitfly) (Stark et al. 2007; Lai et al. 2003; Aravin et al. 2003; Ruby et al. 2007; Sempere et al. 2003),

Bombyx mori (silkworm) (Tong et al. 2006; He et al. 2008; Yu et al. 2008; Liu et al. 2010), *Apis mellifera* (honey bee) (Chen et al. 2010; Weaver et al. 2007), *Mus musculus* (mouse) (Landgraf et al. 2007; Chiang et al. 2010; Lagos-Quintana et al. 2002; Dostie et al. 2003; Ahn et al. 2010; Zhu et al. 2010), *Homo sapiens* (human) (Landgraf et al. 2007; Dostie et al. 2003; Lim et al. 2003a; Lui et al. 2007; Koh et al. 2010), *Caenorhabditis elegans* (roundworm) (Lau et al. 2001; Lim et al. 2003b; Ambros et al. 2003; Grad et al. 2003; Zisoulis et al. 2010; Warf et al. 2011; Kato et al. 2009; Lagos-Quintana et al. 2001; Lee and Ambros 2001; Ruby et al. 2006) และ *Daphnia pulex* (Wheeler et al. 2009) กลุ่มของ miRNA ที่มีความอนุรักษ์ในสิ่งมีชีวิตกลุ่ม arthropod ได้แก่ pmo-miR-252-3p pmo-miR-2a-3p pmo-miR-307a-3p pmo-miR-92b-3p pmo-bantam pmo-miR-275-3p pmo-miR-276a-3p pmo-miR-279 pmo-miR-305-5p pmo-miR-317-3p pmo-miR-71-5p และ pmo-miR-965 (Stark et al. 2007; Lai et al. 2003; Aravin et al. 2003; Ruby et al. 2007; Sempere et al. 2003; Tong et al. 2006; He et al. 2008; Yu et al. 2008; Liu et al. 2010; Chen et al. 2010; Weaver et al. 2007; Wheeler et al. 2009)

จากการศึกษาชนิดของ miRNA ที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลาดำ จึงได้เลือก miRNA จำนวน 16 ชนิด มาทำการวิเคราะห์การแสดงออกของ miRNA ที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยเทคนิค stem-loop real-time PCR พบว่ามี miRNA 11 ชนิดที่แสดงออกเปลี่ยนแปลงไปเมื่อติดเชื้อไวรัส และมี pmo-miR-750 และ pmo-miR-315 ที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปอย่างมากเมื่อมีการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ในอวัยวะน้ำเหลืองของ *M. japonicus* ที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว พบว่ามีระดับการแสดงออกของ miR-315 เพิ่มขึ้นที่ระยะ Late phase ของการติดเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับการติดเชื้อไวรัสในกึ่งกลาดำที่มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นที่ 48 ชั่วโมงหลังจากการติดเชื้อ (Huang et al. 2012) ในตับอ่อนของ *Macrobrachium rosenbergii* พบว่ามีระดับการแสดงออกของ miR-750 สูง แต่เมื่อเกิดติดเชื้อ hypodermal and hematopoietic necrosis (IHHNV) การแสดงของ miR-750 ไม่เปลี่ยนแปลง (Tan et al. 2013). ซึ่งตรงกันข้ามกับในเม็ดเลือดกึ่งกลาดำ pmo-miR-750 มีการแสดงออกลดลงอย่างมากเมื่อมีการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

การหานายินเป้าหมายของ miRNA โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ เนื่องจากกึ่งกลาดำนั้นยังไม่มีลำดับจีโนม จึงจำเป็นต้องใช้ฐานข้อมูล EST เพื่อใช้ในการหาหน้าที่ของ miRNA จากการหานายพบว่ามี miRNA หลายชนิด สามารถจับได้ 5'UTR 3'UTR และ ORF ของยีนเป้าหมายได้ (Akbari et al. 2013) และจากนั้นทำการยืนยันผลการทำนายการจับกันของ miRNA กับยีนเป้าหมายโดยการทดลอง *in vitro* miRNA reporter assay (Watanabe et al. 2006) ในงานวิจัยนี้สนใจ miRNA ที่มีเป้าหมายที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน เช่น เปปไทด์ต้านจุลชีพ การสื่อสารระหว่างเซลล์ โปรตีนฮีสซ็อค โปรตีนเอส ตัวยับยั้งโปรตีเอส การแข็งตัวของเลือด โปรแกรมการตายของเซลล์ และระบบโพรพีนอลออกซิเดส ซึ่งจากการหานายพบว่ามี miRNA หนึ่งชนิดสามารถจับกับยีนเป้าหมายได้หลายชนิด ยีนหนึ่งชนิดสามารถควบคุมโดย miRNA หลายชนิดได้เช่นเดียวกัน (Lewis et al. 2005)

ใน *D. melanogaster* พบว่า bantam มีหน้าที่ในการควบคุมโปรแกรมการตายของเซลล์ (Xu et al. 2003) และเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของตาและปีก (Hipfner et al. 2002) bantam จากการหานายหน้าที่ของ miRNA ในกึ่งกลาดำ พบว่า pmo-bantam อาจจะมีหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของ Kunitz-type serine protease inhibitor ซึ่งยีนเป้าหมายนี้ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด การกลไกการป้องกันสิ่งแปลกปลอม และ

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ในกุ้ง *Fenneropenaeus chinensis* มีการศึกษา Kunitz-type serine protease inhibitor (FcKuSPI) พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของทริปซินได้ และสามารถเพิ่มระยะเวลาการแข็งตัวของเลือด (Kong et al. 2013) จากการทดลองความสามารถในการจับกันของ pmo-bantam กับ KuSPI ด้วยวิธี luciferase reporter assay พบว่า pmo-bantam นั้นสามารถลดการแสดงออกของ KuSPI เมื่อวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ pmo-bantam และ KuSPI ในเนื้อเยื่อต่างๆที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน พบว่าในอวัยวะน้ำเหลือง pmo-bantam สามารถที่จะควบคุมการแสดงออกของ KuSPI ได้ ซึ่งหน้าที่ของ pmo-bantam และ KuSPI ยังคงต้องศึกษาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Ahn HW, Morin RD, Zhao H, Harris RA, Coarfa C, Chen ZJ, Milosavljevic A, Marra MA, Rajkovic A (2010) MicroRNA transcriptome in the newborn mouse ovaries determined by massive parallel sequencing. *Molecular human reproduction* 16 (7):463-471. doi:10.1093/molehr/gaq017
- Akbari OS, Antoshechkin I, Amrhein H, Williams B, Diloreto R, Sandler J, Hay BA (2013) The developmental transcriptome of the mosquito *Aedes aegypti*, an invasive species and major arbovirus vector. *G3* 3 (9):1493-1509. doi:10.1534/g3.113.006742
- Ambros V, Lee RC, Lavanway A, Williams PT, Jewell D (2003) MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Current biology* : CB 13 (10):807-818
- Aravin AA, Lagos-Quintana M, Yalcin A, Zavolan M, Marks D, Snyder B, Gaasterland T, Meyer J, Tuschl T (2003) The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Developmental cell* 5 (2):337-350
- Bachère E (2000) Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture* 191 (1):3-11
- Chen X, Yu X, Cai Y, Zheng H, Yu D, Liu G, Zhou Q, Hu S, Hu F (2010) Next-generation small RNA sequencing for microRNAs profiling in the honey bee *Apis mellifera*. *Insect molecular biology* 19 (6):799-805. doi:10.1111/j.1365-2583.2010.01039.x
- Chiang HR, Schoenfeld LW, Ruby JG, Auyeung VC, Spies N, Baek D, Johnston WK, Russ C, Luo S, Babiarz JE, Blelloch R, Schroth GP, Nusbaum C, Bartel DP (2010) Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes & development* 24 (10):992-1009. doi:10.1101/gad.1884710
- Donpudsa S, Soderhall I, Rimphanitchayakit V, Cerenius L, Tassanakajon A, Soderhall K (2010) Proteinase inhibitory activities of two two-domain Kazal proteinase inhibitors from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* and the importance of the P(2) position in proteinase inhibitory activity. *Fish Shellfish Immunol* 29 (5):716-723. doi:10.1016/j.fsi.2010.07.001
- Dostie J, Mourelatos Z, Yang M, Sharma A, Dreyfuss G (2003) Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs. *Rna* 9 (2):180-186
- Fullaondo A, Lee SY (2012) Regulation of *Drosophila*-virus interaction. *Developmental and comparative immunology* 36 (2):262-266. doi:10.1016/j.dci.2011.08.007
- Grad Y, Aach J, Hayes GD, Reinhart BJ, Church GM, Ruvkun G, Kim J (2003) Computational and experimental identification of *C. elegans* microRNAs. *Molecular cell* 11 (5):1253-1263
- He PA, Nie Z, Chen J, Chen J, Lv Z, Sheng Q, Zhou S, Gao X, Kong L, Wu X, Jin Y, Zhang Y (2008) Identification and characteristics of microRNAs from *Bombyx mori*. *BMC genomics* 9:248. doi:10.1186/1471-2164-9-248

- He Y, Yang K, Zhang X (2014) Viral microRNAs targeting virus genes promote virus infection in shrimp in vivo. *Journal of virology* 88 (2):1104-1112. doi:10.1128/JVI.02455-13
- He Y, Zhang X (2012) Comprehensive characterization of viral miRNAs involved in white spot syndrome virus (WSSV) infection. *RNA biology* 9 (7):1019-1029. doi:10.4161/rna.20741
- Hipfner DR, Weigmann K, Cohen SM (2002) The bantam gene regulates *Drosophila* growth. *Genetics* 161 (4):1527-1537
- Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A (2003) Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes & development* 17 (18):2205-2232. doi:10.1101/gad.1102703
- Huang T, Cui Y, Zhang X (2014) Involvement of viral microRNA in the regulation of antiviral apoptosis in shrimp. *Journal of virology* 88 (5):2544-2554. doi:10.1128/JVI.03575-13
- Huang T, Xu D, Zhang X (2012) Characterization of host microRNAs that respond to DNA virus infection in a crustacean. *BMC genomics* 13:159. doi:10.1186/1471-2164-13-159
- Kato M, de Lencastre A, Pincus Z, Slack FJ (2009) Dynamic expression of small non-coding RNAs, including novel microRNAs and piRNAs/21U-RNAs, during *Caenorhabditis elegans* development. *Genome biology* 10 (5):R54. doi:10.1186/gb-2009-10-5-r54
- Kelly BJ, Fraefel C, Cunningham AL, Diefenbach RJ (2009) Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virus research* 145 (2):173-186. doi:10.1016/j.virusres.2009.07.007
- Kirchhoff S, Sebens T, Baumann S, Krueger A, Zawatzky R, Li-Weber M, Meinl E, Neipel F, Fleckenstein B, Krammer PH (2002) Viral IFN-regulatory factors inhibit activation-induced cell death via two positive regulatory IFN-regulatory factor 1-dependent domains in the CD95 ligand promoter. *Journal of immunology* 168 (3):1226-1234
- Koh W, Sheng CT, Tan B, Lee QY, Kuznetsov V, Kiang LS, Tanavde V (2010) Analysis of deep sequencing microRNA expression profile from human embryonic stem cells derived mesenchymal stem cells reveals possible role of let-7 microRNA family in downstream targeting of hepatic nuclear factor 4 alpha. *BMC genomics* 11 Suppl 1:S6. doi:10.1186/1471-2164-11-S1-S6
- Kong HJ, Lee YJ, Park IS, Lee WW, Kim YO, Nam BH, Kim WJ, Jung H, Jeon YJ, An CM, Lee SJ (2013) Molecular and functional characterizations of a Kunitz-type serine protease inhibitor FcKuSPI of the shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol* 35 (3):1025-1029. doi:10.1016/j.fsi.2013.06.023
- Kramer MF (2011) Stem-loop RT-qPCR for miRNAs. *Current protocols in molecular biology* / edited by Frederick M Ausubel [et al] Chapter 15:Unit 15 10. doi:10.1002/0471142727.mb1510s95
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294 (5543):853-858. doi:10.1126/science.1064921

- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T (2002) Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Current biology* : CB 12 (9):735-739
- Lai EC, Tomancak P, Williams RW, Rubin GM (2003) Computational identification of *Drosophila* microRNA genes. *Genome biology* 4 (7):R42. doi:10.1186/gb-2003-4-7-r42
- Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, Pfeffer S, Rice A, Kamphorst AO, Landthaler M, Lin C, Socci ND, Hermida L, Fulci V, Chiaretti S, Foa R, Schliwka J, Fuchs U, Novosel A, Muller RU, Schermer B, Bissels U, Inman J, Phan Q, Chien M, Weir DB, Choksi R, De Vita G, Frezzetti D, Trompeter H, Hornung V, Teng G, Hartmann G, Palkovits M, Di Lauro R, Wernet P, Macino G, Rogler CE, Nagle JW, Ju J, Papavasiliou FN, Benzing T, Lichter P, Tam W, Brownstein MJ, Bosio A, Borkhardt A, Russo JJ, Sander C, Zavolan M, Tuschl T (2007) A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 129 (7):1401-1414. doi:10.1016/j.cell.2007.04.040
- Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294 (5543):858-862. doi:10.1126/science.1065062
- Lee RC, Ambros V (2001) An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294 (5543):862-864. doi:10.1126/science.1065329
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120 (1):15-20
- Lim LP, Glasner ME, Yekta S, Burge CB, Bartel DP (2003a) Vertebrate microRNA genes. *Science* 299 (5612):1540. doi:10.1126/science.1080372
- Lim LP, Lau NC, Weinstein EG, Abdelhakim A, Yekta S, Rhoades MW, Burge CB, Bartel DP (2003b) The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes & development* 17 (8):991-1008
- Liu S, Li D, Li Q, Zhao P, Xiang Z, Xia Q (2010) MicroRNAs of *Bombyx mori* identified by Solexa sequencing. *BMC genomics* 11:148. doi:10.1186/1471-2164-11-148
- Lui WO, Pourmand N, Patterson BK, Fire A (2007) Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer. *Cancer research* 67 (13):6031-6043. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0561
- Lyman MG, Enquist LW (2009) Herpesvirus interactions with the host cytoskeleton. *Journal of virology* 83 (5):2058-2066. doi:10.1128/JVI.01718-08
- Macian F (2005) NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nature reviews Immunology* 5 (6):472-484. doi:10.1038/nri1632
- Manley K, O'Hara BA, Atwood WJ (2008) Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) plays a role in SV40 infection. *Virology* 372 (1):48-55. doi:10.1016/j.virol.2007.10.029
- Nogueira ML, Wang VE, Tantin D, Sharp PA, Kristie TM (2004) Herpes simplex virus infections are arrested in Oct-1-deficient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (6):1473-1478. doi:10.1073/pnas.0307300101

- Prapavorarat A, Pongsomboon S, Tassanakajon A (2010) Identification of genes expressed in response to yellow head virus infection in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, by suppression subtractive hybridization. *Developmental and comparative immunology* 34 (6):611-617. doi:10.1016/j.dci.2010.01.002
- Ruan L, Bian X, Ji Y, Li M, Li F, Yan X (2011) Isolation and identification of novel microRNAs from *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol* 31 (2):334-340. doi:10.1016/j.fsi.2011.05.023
- Ruby JG, Jan C, Player C, Axtell MJ, Lee W, Nusbaum C, Ge H, Bartel DP (2006) Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans*. *Cell* 127 (6):1193-1207. doi:10.1016/j.cell.2006.10.040
- Ruby JG, Stark A, Johnston WK, Kellis M, Bartel DP, Lai EC (2007) Evolution, biogenesis, expression, and target predictions of a substantially expanded set of *Drosophila* microRNAs. *Genome research* 17 (12):1850-1864. doi:10.1101/gr.6597907
- Saksmerprome V, Charoonnart P, Gangnonngiw W, Withyachumnarnkul B (2009) A novel and inexpensive application of RNAi technology to protect shrimp from viral disease. *Journal of virological methods* 162 (1-2):213-217. doi:10.1016/j.jviromet.2009.08.010
- Sempere LF, Sokol NS, Dubrovsky EB, Berger EM, Ambros V (2003) Temporal regulation of microRNA expression in *Drosophila melanogaster* mediated by hormonal signals and broad-Complex gene activity. *Developmental biology* 259 (1):9-18
- Stark A, Kheradpour P, Parts L, Brennecke J, Hodges E, Hannon GJ, Kellis M (2007) Systematic discovery and characterization of fly microRNAs using 12 *Drosophila* genomes. *Genome research* 17 (12):1865-1879. doi:10.1101/gr.6593807
- Tan TT, Chen M, Harikrishna JA, Khairuddin N, Mohd Shamsudin MI, Zhang G, Bhassu S (2013) Deep parallel sequencing reveals conserved and novel miRNAs in gill and hepatopancreas of giant freshwater prawn. *Fish Shellfish Immunol* 35 (4):1061-1069. doi:10.1016/j.fsi.2013.06.017
- Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N (2001) IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annual review of immunology* 19:623-655. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.623
- Tassanakajon A, Amparyup P, Somboonwiwat K, Supungul P (2011) Cationic antimicrobial peptides in penaeid shrimp. *Marine biotechnology* 13 (4):639-657. doi:10.1007/s10126-011-9381-8
- Tong CZ, Jin YF, Zhang YZ (2006) Computational prediction of microRNA genes in silkworm genome. *Journal of Zhejiang University Science B* 7 (10):806-816. doi:10.1631/jzus.2006.B0806
- Tsai JM, Wang HC, Leu JH, Wang AH, Zhuang Y, Walker PJ, Kou GH, Lo CF (2006) Identification of the nucleocapsid, tegument, and envelope proteins of the shrimp white spot syndrome virus virion. *Journal of virology* 80 (6):3021-3029. doi:10.1128/JVI.80.6.3021-3029.2006

- Vatanavicharn T, Prapavorarat A, Jaree P, Somboonwiwat K, Tassanakajon A (2014) *PmVRP15*, a novel viral responsive protein from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, promoted white spot syndrome virus replication. *PloS one* 9 (3):e91930. doi:10.1371/journal.pone.0091930
- Warf MB, Johnson WE, Bass BL (2011) Improved annotation of *C. elegans* microRNAs by deep sequencing reveals structures associated with processing by Drosha and Dicer. *Rna* 17 (4):563-577. doi:10.1261/rna.2432311
- Watanabe T, Takeda A, Tsukiyama T, Mise K, Okuno T, Sasaki H, Minami N, Imai H (2006) Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes. *Genes & development* 20 (13):1732-1743. doi:10.1101/gad.1425706
- Weaver DB, Anzola JM, Evans JD, Reid JG, Reese JT, Childs KL, Zdobnov EM, Samanta MP, Miller J, Elisk CG (2007) Computational and transcriptional evidence for microRNAs in the honey bee genome. *Genome biology* 8 (6):R97. doi:10.1186/gb-2007-8-6-r97
- Wheeler BM, Heimberg AM, Moy VN, Sperling EA, Holstein TW, Heber S, Peterson KJ (2009) The deep evolution of metazoan microRNAs. *Evolution & development* 11 (1):50-68. doi:10.1111/j.1525-142X.2008.00302.x
- Xie X, Yang F (2005) Interaction of white spot syndrome virus VP26 protein with actin. *Virology* 336 (1):93-99. doi:10.1016/j.virol.2005.03.011
- Xu P, Vernooij SY, Guo M, Hay BA (2003) The *Drosophila* microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Current biology : CB* 13 (9):790-795
- Yang G, Yang L, Zhao Z, Wang J, Zhang X (2012) Signature miRNAs involved in the innate immunity of invertebrates. *PloS one* 7 (6):e39015. doi:10.1371/journal.pone.0039015
- Yodmuang S, Tirasophon W, Roshorm Y, Chinnirunvong W, Panyim S (2006) YHV-protease dsRNA inhibits YHV replication in *Penaeus monodon* and prevents mortality. *Biochemical and biophysical research communications* 341 (2):351-356. doi:10.1016/j.bbrc.2005.12.186
- Yu X, Zhou Q, Li SC, Luo Q, Cai Y, Lin WC, Chen H, Yang Y, Hu S, Yu J (2008) The silkworm (*Bombyx mori*) microRNAs and their expressions in multiple developmental stages. *PloS one* 3 (8):e2997. doi:10.1371/journal.pone.0002997
- Zhu JY, Strehle M, Frohn A, Kremmer E, Hofig KP, Meister G, Adler H (2010) Identification and analysis of expression of novel microRNAs of murine gammaherpesvirus 68. *Journal of virology* 84 (19):10266-10275. doi:10.1128/JVI.01119-10
- Zisoulis DG, Lovci MT, Wilbert ML, Hutt KR, Liang TY, Pasquinelli AE, Yeo GW (2010) Comprehensive discovery of endogenous Argonaute binding sites in *Caenorhabditis elegans*. *Nature structural & molecular biology* 17 (2):173-179. doi:10.1038/nsmb.1745

ผลลัพธ์ของโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ จำนวน 1 เรื่อง

1. Vatanavicharn T., Prapavorarat A., Jaree P., Somboonwiwat K., Tassanakajon A. *PmVRP15*, a novel viral responsive protein from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, promoted white spot syndrome virus replication. PLoS One. 2014 Mar 17;9(3):e91930

ผลงานต้นฉบับสำหรับตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ จำนวน 2 เรื่อง

1. Jaree P., Somboonwiwat K., Phiwisaiya K., Senapin S., Hirono I., Lo CF., Tassanakajon A., WSV399, the *PmVRP15*-interacting protein, from white spot syndrome virus involved in viral assembly process.
2. Kaewkascholkul N., Somboonwiwat K., Tassanakajon A., Somboonwiwat K., Identification and characterization of miRNAs that involved in WSSV infection in *Penaeus monodon*.

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เชิงวิชาการ

จากผลงานวิจัยนี้ได้นำความรู้ และประสบการณ์วิจัยมาใช้ในการพัฒนาการเรียนการสอน ทางด้านชีวเคมีและชีววิทยาโมเลกุล อีกทั้งงานวิจัยนี้มีประโยชน์ในการสร้างนักวิจัยใหม่ โดยมีจำนวนนิสิตที่จบการศึกษา 2 คน แบ่งเป็นนิสิตระดับปริญญาเอก 1 คน และนิสิตระดับปริญญาโท 1 คน

3. อื่น ๆ

บทความวิจัยในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ (Proceeding) จำนวน 1 เรื่อง

1. Kaewkascholkul, N., Ittichaicharoen, N., Somboonwiwat, K., Tassanakajon, A., Somboonwiwat, K. Identification of miRNAs involved in WSSV infection from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, by next generation sequencing. Next Generation Sequencing for Genetic and Genomic Studies (NGS2014), 29 - 30 July 2014 Bangkok.

การนำเสนอผลงาน

-นำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ 2 เรื่อง

1. Jaree, P., Somboonwiwat, K., Tassanakajon, A. RNAi knockdown of *Penaeus monodon* viral responsive protein 15 (*PmVRP15*) reduces WSSV replication in shrimp. 13th FAOBMB Congress, 25-29 November 2012, Bangkok, Thailand.
2. Kaewkascholkul, N., Somboonwiwat, K., Tassanakajon, A., Somboonwiwat, K., Identification of miRNAs involved in WSSV infection in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. The 18th Biological Sciences Graduate Congress (BSGC 2014), 6-7 January 2014, Kuala Lumpur, Malaysia.

-นำเสนอผลงานแบบปากเปล่าในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ 4 เรื่อง

1. Jaree, P., Somboonwiwat, K., Tassanakajon, A. Genomic organization and promoter activity of a viral responsive protein from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. 17th Biological Sciences Graduate Congress, 8-10 December 2012, Bangkok, Thailand.

2. Jaree, P., Somboonwiwat, K., Lo, C. F., Tassanakajon, A., Genome organization and promoter analysis of a highly WSSV-inducible gene, viral responsive protein 15 (*PmVRP15*) from *Penaeus monodon*. The 10th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference (APMBC 2014), 4 - 8 May 2014, Taipei, Taiwan.

3. Jaree, P., Somboonwiwat, K., Lo, C. F., Tassanakajon, A., Genomic organization and promoter characterization of a viral responsive protein 15 (*PmVRP15*) from black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. The 4th International Biochemistry and Molecular Biology Conference 2014, 2 – 3 April 2014, Bangkok, Thailand.

4. Kaewkascholkul, N., Somboonwiwat, K., Tassanakajon, A., Somboonwiwat, K., Identification of miRNAs involved in WSSV infection in *Penaeus monodon*. The 4th International Biochemistry and Molecular Biology Conference 2014, 2 – 3 April 2014, Bangkok, Thailand.

-นำเสนอผลงานแบบปากเปล่าในงานประชุมวิชาการระดับชาติ 1 เรื่อง

1. Jaree, P., Somboonwiwat, K., Lo, C. F., Tassanakajon, A., Functional characterization and gene regulation of a novel viral responsive protein 15 (*PmVRP15*) from *Penaeus monodon*. The RGJ-Ph.D. Congress XV, 28 – 29 May 2014, Chonburi, Thailand.

-นำเสนอผลงานแบบปากเปล่าในงานประชุมวิชาการระดับคณะ 2 เรื่อง

1. Jaree, P., Somboonwiwat, K., Lo, C. F., Tassanakajon, A., Functional characterization and promoter analysis of a viral responsive protein 15 (*PmVRP15*) gene from black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. The science forum 2014, 20 – 21 March 2014, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

2. Kaewkascholkul, N., Ittichaichareon, N., Somboonwiwat, K., Tassanakajon, A., Somboonwiwat, K., Identification and characterization of miRNAs involved in WSSV infection in *Penaeus monodon*. The science forum 2014, 20 – 21 March 2014, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

รางวัลที่ได้รับ

1. น.ส.ภัทรรันดา จารีย์ นิสิตในโครงการ ได้รับรางวัล “SILVER MEDALIST” จากการนำเสนอผลงานแบบปากเปล่า เรื่อง “Genomic organization and promoter activity of a viral responsive protein from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*” ในงานประชุมวิชาการ 17th Biological Sciences Graduate Congress, วันที่ 8-10 ธันวาคม 2555

2. น.ส. ภัทรรันดา จารีย์ นิสิตในโครงการได้รับรางวัล “ชนะเลิศ” จากการนำเสนอผลงานแบบปากเปล่าเรื่อง “Functional characterization and promoter analysis of a viral responsive protein 15 (*PmVRP15*) gene from black tiger shrimp, *Penaeus monodon*” ในงานประชุมวิชาการ The Science Forum 2014 วันที่ 20 - 21 มกราคม 2557

3. น.ส. ภัทรรันดา จารีย์ นิสิตในโครงการได้รับรางวัล “The outstanding oral presentation” จากการนำเสนอผลงานแบบปากเปล่าเรื่อง “Functional characterization and gene regulation of a novel viral responsive protein 15 (*PmVRP15*) from *Penaeus monodon*” ในงานประชุมวิชาการ “RGJ-Ph.D. Congress XV” วันที่ 28 - 30 พฤษภาคม 2557

4. นาย ณพล แก้วเกษตรกุล นิสิตในโครงการได้รับรางวัล “Silver medal winner” จากการนำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์เรื่อง “Identification of miRNAs involved in WSSV infection in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*.” ในงานประชุมวิชาการ “The 18th Biological Sciences Graduate Congress” วันที่ 6 - 7 มกราคม 2557
5. ผศ.ดร.กฤษยา สมบูรณ์วิวัฒน์ ได้รับรางวัลนักวิจัยรุ่นใหม่ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปี 2557 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วันที่ 24 มีนาคม 2558
6. ผศ.ดร.กฤษยา สมบูรณ์วิวัฒน์ ได้รับรางวัลนักวิจัยรุ่นกลางดีเด่น สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ประจำปี 2558 กองทุนเพื่อการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วันที่ 24 มีนาคม 2558