



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ หน้าที่ของ **kruppel like factor** ชนิดใหม่จากกิ้งก่าหางไม้ต่อ

การติดเชื้อไวรัสทอรา

โดย ดร. เปรมฤทัย สุพรรณกุล

มิถุนายน 2563

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ หน้าทีของ **kruppel like factor** ชนิดใหม่จากกุ้งแวนนาไมต่อ

การติดเชื้อไวรัสทอรา

ดร. เปรมฤทัย สุพรรณกุล

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและ
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย

สกว.และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

Project Code : RSA5880063

Project Title : Role of novel *Litopenaeus vannamei* kruppel like factors (LvKLFs) in Taura Syndrome Virus infection

Investigator : Dr. Premruethai Supungul

E-mail Address : premruethai.sup@biotec.or.th

Project Period : 2 years

Kruppel-like factors (KLFs) belong to a family of zinc finger-containing transcription factors. These proteins are involved in several biological processes, including proliferation, differentiation, development, activation and apoptosis. Herein, a novel KLF from the *Litopenaeus vannamei* (LvKLF) was investigated. The full-length cDNA of LvKLF was 2,070 bp with an open reading frame of 1,830 bp that encodes a putative protein of 610 amino acids. A novel LvKLF contains 7 conserved ZnF_C2H2 domains at the N-terminus. Multiple alignment analysis revealed that this LvKLF and other KLFs in multiple-adjacent-C2H2 (maZnF_C2H2) type shared high conserved residues. Quantitative real-time PCR analysis revealed that LvKLF transcript was highly expressed in hemocyte of the normal shrimp. The expression of the LvKLF transcript in TSV-resistant *Litopenaeus vannamei* was significantly lower than that in the TSV susceptible *Litopenaeus vannamei*. To clarify the biological function of KLF upon TSV infection, yeast two hybrids were examined. The result revealed that LvKLF interacted with 3 non-structural proteins of TSV, BIR, Helicase and RNA-dependent RNA polymerase and 2 structural proteins, VP2 and VP3. Taken together, these results indicated that LvKLF involved in the TSV infection in shrimp. Gene organization revealed that LvKLF contained 4 exons interrupted by 4 introns whilst the upstream sequence contained a putative promoter with potential binding site for GATA, AP, Sp1, C/EBP α . Moreover, the 2 SNPs (intron1 (389, G/A); intron2 (256, AA/-T)) were identified in intron of the TSV resistant shrimp. These SNPs will be tested association for the TSV resistance in *L. vannamei*.

Keywords : *Litopenaeus vannamei*, Kruppel-like factor, TSV-resistant shrimp, SNP

รหัสโครงการ: RSA5880063

ชื่อโครงการ: หน้าที่ของ kruppel like factor ชนิดใหม่จากกุ้งแวนนาไมต่อการติดเชื้อไวรัสทอรา
ชื่อนักวิจัย: ด.ร. เปรมฤทัย สุพรรณกุล

E-mail Address : premruethai.sup@biotec.or.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

Kruppel-like factor (KLFs) จัดอยู่ในกลุ่มของ zinc finger-containing transcription factors family ซึ่งโปรตีนในกลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวโมเลกุลหลายกระบวนการ รวมทั้ง proliferation, differentiation, development, activation และ apoptosis ในงานวิจัยนี้ ได้ศึกษา kruppel like factor ชนิดใหม่จากกุ้งแวนนาไม (LvKLF) ยีนสมบูรณ์ประกอบด้วย 2,070 เบส มี Open reading frame ขนาด 1,830 เบส ถอดรหัสได้เป็นโปรตีนขนาด 610 กรดอะมิโน LvKLF นี้ ประกอบด้วย บริเวณอนุรักษ ZnF_C2H2 7 domain เรียงต่อกันทางปลายด้านอะมิโน เมื่อเปรียบเทียบกับ KLF ที่อยู่ในกลุ่ม multiple-adjacent-C2H2 (maZnF_C2H2) type พบว่ากลุ่มนี้มีความเหมือนกันสูง การศึกษาการแสดงออกของยีน LvKLF ในเนื้อเยื่อต่างๆของกุ้งปกติด้วยเทคนิค real-time RT-PCR พบยีน LvKLF แสดงออกมากที่สุด ในเม็ดเลือด นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนนี้ในกุ้งที่ต้านทานไวรัสทอราและไม่ต้านทานไวรัสทอรา พบว่ายีนนี้มีการแสดงออกต่ำอย่างมีนัยสำคัญในกุ้งสายพันธุ์ไม่ต้านทานไวรัสทอรา เพื่อศึกษาปฏิสัมพันธ์ของ LvKLF กับโปรตีนของไวรัส จึงใช้เทคนิค yeast two hybrid ซึ่งพบว่า LvKLF มีปฏิสัมพันธ์กับ non-structural proteins ของไวรัสทอรา 3 ชนิด ได้แก่ BIR, Helicase และ RNA-dependent RNA polymerase และกับ structural proteins ของไวรัสทอรา 2 ชนิด ได้แก่ VP2 และ VP3 จากทั้งหมดที่กล่าวมา ชี้ให้เห็นว่า LvKLF มีความสำคัญเกี่ยวกับการติดเชื้อไวรัสทอราในกุ้ง เมื่อศึกษาการจัดเรียงตัวของยีน LvKLF ในจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ พบยีนนี้ประกอบด้วย 4 exons ที่แทรกด้วย 4 introns และมี putative promoter และ บริเวณที่คาดว่าจะ เป็น GATA, AP, Sp1, C/EBP binding อยู่ที่ upstream sequence ยิ่งไปกว่านั้น พบ SNP จำนวน 2 ตำแหน่ง ใน intron 1 (389, G/A) และ intron 2 (256, AA-T) เมื่อเปรียบเทียบดีเอ็นเอของกุ้งสายพันธุ์ต้านทานและไม่ต้านทานไวรัสทอรา ซึ่ง SNPs ที่ได้นี้ จะนำไปทดสอบความสัมพันธ์กับการต้านทานไวรัสในกุ้งแวนนาไมต่อไป

คำหลัก : *Litopenaeus vannamei*, Kruppel-like factor, TSV-resistant shrimp, SNP

Executive summary

ชื่อโครงการ: หน้าที่ยของ *kruppel like factor* ชนิดใหม่จากกุ้งแวนนาไม่ต่อการติดเชื้อไวรัส

ทอรา

ชื่อหัวหน้าโครงการ: ดร.เปรมฤทัย สุพรรณกุล

ศูนย์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

ปัญหา ที่มา และวัตถุประสงค์ของโครงการ

ปัญหาการติดเชื้อก่อโรค ทั้งไวรัสและแบคทีเรียยังคงเป็นปัญหาสำคัญสำหรับอุตสาหกรรม การเพาะเลี้ยงกุ้ง ซึ่งมีผลกระทบต่อการส่งออกกุ้งของประเทศไทยเป็นอย่างมาก มีความพยายามใช้เทคนิค ทางชีวโมเลกุลต่าง ๆ มากมายเพื่อวินิจฉัยและป้องกันการเกิดโรคระบาด แต่พบว่ายังไม่สามารถนำไปใช้ได้จริง ในการเพาะเลี้ยง ดังนั้นการเข้าใจกลไกการป้องกันโรคติดเชื้อในกุ้งจึงมีความจำเป็นเพื่อพัฒนาและส่งเสริมให้ กุ้งมีสุขภาพดีทนทานต่อโรคติดเชื้อต่อไป นอกจากนี้ จากการประสบความสำเร็จในการคัดเลือกสายพันธุ์ กุ้งขาวสายพันธุ์ต้านทานไวรัสทอราจึงชี้ให้เห็นว่า คัดเลือกสายพันธุ์กุ้งต้านทานโรคเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่จะ นำไปสู่การพัฒนาอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งอย่างยั่งยืน

จากรายงาน การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในกุ้งขาวปกติสายพันธุ์ต้านทานไวรัส ทอราและไม่ต้านทานไวรัสทอราด้วยเทคนิค RNA-seq (Sookruksawong et al., 2013) พบยีนที่มีการ แสดงออกแตกต่างกันมากมาย โดยเฉพาะยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งมี 2 number ที่คล้ายกับ บางส่วนของยีน *kruppel-like factor (KLF)* มีการแสดงออกของยีนต่ำในสายพันธุ์ต้านทานไวรัสทอราเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ไม่ต้านทานไวรัสทอรา โดยโปรตีนในกลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับขบวนการทางชีวโมเลกุลหลายขบวนการ รวมทั้ง proliferation, differentiation, development, activation และ apoptosis มีรายงานการศึกษา ยีน *KLF* จากกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำ ซึ่งยีนประกอบด้วย Zn finger (ZnF_C2H2) จำนวน 3 domain เรียงต่อกันทางด้านปลายคาร์บอกซิล พบว่าเมื่อยับยั้งการแสดงออกของยีนนี้แล้วทำให้ติดเชื้อ WSSV กุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออก ของยีนนี้จะเข้าสู่ภาวะ moribund ช้ากว่ากุ้งปกติ และพบมีจำนวน copy number ของไวรัสต่ำกว่ากุ้ง ปกติ นอกจากนี้ยังพบ KLF จับกับ IE1 ซึ่งเป็นยีนของไวรัส WSSV ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้ จึงสนใจศึกษา KLF ชนิดใหม่จากกุ้งขาวแวนนาไม่ต่อการติดเชื้อไวรัสทอรา และหาความแตกต่างระดับจีโนมิกส์ DNA ของ

ยีนนี้ระหว่างกิ่งสองสายพันธุ์เพื่อพัฒนาไปเป็นโมเลกุลเครื่องหมายเพื่อบ่งชี้สายพันธุ์กิ่งด้านทานไวรัสทอราต่อไป

ผลการดำเนินงาน

เมื่อทำการหาถิ่นสมบูรณ์ของยีน *LvKLF* พบว่า ยีนประกอบด้วย 2,070 เบส มี open reading frame ขนาด 1,830 เบส โดยมีปลาย 5' และ 3' UTR ขนาด 240 และ 305 เบสตามลำดับ ถอดรหัสได้เป็นโปรตีนขนาด 610 กรดอะมิโน จากการวิเคราะห์พบว่า *LvKLF* ที่พบเป็นชนิดใหม่ ซึ่งยังไม่มีการศึกษาในกิ่ง *LvKLF* ประกอบด้วย ZnF_C2H2 7 domain เรียงต่อกันที่ปลายทางด้านอะมิโน โดย *LvKLF* นี้จัดเป็นชนิดที่ 2 multiple-adjacent-C2H2 (maZnF_C2H2) type ที่ประกอบด้วย Zinc finger domain จำนวนตั้งแต่ 4 domain ขึ้นไป ซึ่งสามารถพบได้ถึง 30 domain และสามารถจับได้กับทั้งโปรตีน ดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ เมื่อเปรียบเทียบกับ KLF ชนิดที่ 1 ที่ประกอบด้วย Zn finger 3 domain และ KLF ชนิดที่ 2 จาก crustacean arthropod และสัตว์มีกระดูกสันหลัง พบว่า แยกออกเป็น 2 กลุ่มชัดเจนตามชนิดของ KLF ซึ่งแต่ละกลุ่มจะมีบริเวณอนุรักษ์ที่ Zn finger และ ในกลุ่มของ KLF ชนิดที่ 2 ที่ประกอบด้วย 7-8 domain พบมีบริเวณอนุรักษ์สูง โดยเฉพาะบริเวณอนุรักษ์ที่เชื่อมต่อกันระหว่าง ZnF_C2H2 ที่เชื่อมต่อกับ TGERP และ TKE(R/K)P

เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *LvKLF* ในเนื้อเยื่อต่างๆของกิ่งปกติด้วยเทคนิค real-time RT-PCR พบว่า ยีน *LvKLF* มีการแสดงออกมากที่สุดในเมล็ดเลือด เมื่อทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนนี้ในกิ่งที่ด้านทานและไม่ด้านทานไวรัสทอราในสภาวะปกติ พบว่า มีการแสดงออกของยีนนี้ต่ำอย่างมีนัยสำคัญในกิ่งสายพันธุ์ด้านทานไวรัสทอราเมื่อเทียบกับกิ่งสายพันธุ์ไม่ด้านทานไวรัสทอรา เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ ของยีนนี้กับโปรตีนของไวรัสทอรา จึงอาศัยเทคนิค yeast two hybrid ซึ่งพบว่า *LvKLF* มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน non-structural proteins ของไวรัสทอรา 3 ชนิด ได้แก่ BIR, Helicase และ RNA-dependent RNA polymerase และกับ 2 structural proteins ของไวรัสทอรา ได้แก่ VP2 และ VP3 จากที่กล่าวมาแล้วทั้งหมดชี้ให้เห็นว่า *LvKLF* มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสทอรา

เมื่อศึกษาการเรียงตัวของยีน *LvKLF* บนจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ พบว่ายีนนี้ ประกอบด้วย 4 exons ที่แทรกด้วย 4 introns และมี putative promoter และ บริเวณที่คาดว่าจะจะเป็น GATA, AP, Sp1, C/EBPα binding อยู่ที่ upstream sequence ยิ่งไปกว่านั้น พบ SNP จำนวน 2 ตำแหน่ง ใน intron 1 (389, G/A) และ intron 2 (256, AA-T) เมื่อเปรียบเทียบดีเอ็นเอของกิ่งสายพันธุ์ด้านทานและไม่ด้านทานไวรัสทอรา ซึ่งจะทำให้การพัฒนาไปเป็น SNP marker สำหรับบ่งชี้กิ่งด้านทานไวรัสทอราต่อไป

ประโยชน์และผลกระทบที่เกิดขึ้นจากผลงาน

- เข้าใจกลไกการติดเชื้อของไวรัสทอรามากยิ่งขึ้น สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อเป็นการป้องกันการเกิดโรคทอราหรือโรคไวรัสชนิดอาร์เอ็นเอไวรัส

- SNP ที่ได้สามารถนำไปพัฒนาเป็น SNP marker สำหรับบ่งชี้กึ่งต้านทานไวรัสทอราต่อไป

1. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

- อยู่ระหว่างจัดทำ manuscript เพื่อตีพิมพ์ผลงานในวารสารนานาชาติ

2. ผลงานวิจัยที่นำเสนอในงานประชุมวิชาการ

-

เนื้อหาทางวิจัย

ชื่อโครงการ :	หน้าที่ของ kruppel like factor ชนิดใหม่จากกุ้งแวนนาไม่ต้องการติดเชื้อไวรัสทอรา
ชื่อหัวหน้าโครงการ	ดร.เปรมฤทัย สุพรรณกุล ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

1. ความสำคัญและที่มา

กุ้งเป็นสินค้าส่งออกประเภทสัตว์น้ำที่มีศักยภาพของไทย โดยประเทศไทยผลิตกุ้งเพื่อการส่งออกมากกว่าการบริโภคภายในประเทศ ที่ผ่านมามีประเทศไทยเคยเป็นผู้นำในการผลิตกุ้งและส่งออกเป็นอันดับหนึ่งของโลกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2533 แต่พบว่าในช่วงหลายปีที่ผ่านมา การเลี้ยงและการส่งออกกุ้งกลับลดน้อยลงเรื่อยๆ โดยปัญหาด้านโรคระบาดจากเชื้อก่อโรคต่างๆในกุ้งยังคงเป็นปัญหาสำคัญ ที่ทำให้เกิดความเสียหายในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันโดยเฉพาะจากเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย ไวรัสก่อโรคที่สำคัญในกุ้งได้แก่ ไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus, WSSV), หัวเหลือง (yellow head virus, YHV), ทอรา (Taura syndrome virus, TSV) และ infectious myonecrosis virus (IMNV) เป็นต้น (Flegel et al., 2004; Lightner 2005; Flegel 2006; Poulos et al., 2006; Senapin et al., 2007) แบคทีเรียที่ก่อโรคสำคัญในกุ้งได้แก่ แบคทีเรียตระกูล vibrio ซึ่งมักก่อโรคในโรงเพาะฟักของกุ้งระยะ post larval (Gopal et al., 2005; Gomez-Gil et al., 2004) และไม่นานมานี้ได้พบการระบาดจาก *Vibrio parahaemolyticus* ที่มีพลาสมิดที่สร้างสารพิษ ทำให้กุ้งตายจำนวนมากภายใน 3 วัน กุ้งที่ติดเชื้อบริเวณตับจะพบเซลล์ถูกทำลาย จึงเรียกโรค acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) (Lightner et al., 2012; Tran et al., 2013) สำหรับไวรัส TSV เริ่มแรกเป็นไวรัสที่ทำให้เกิดความเสียหายในกุ้งขาวเป็นอย่างมาก ปัจจุบันนี้การเพาะเลี้ยงกุ้งขาวประสบความสำเร็จอย่างแพร่หลายทั่วโลก เนื่องจากสามารถคัดสายพันธุ์กุ้งขาวต้านไวรัสทอราได้ ซึ่งช่วยลดอัตราการตายของกุ้งได้มากกว่า 70% เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งที่ไม่ได้ผ่านการพัฒนาสายพันธุ์ (Argue et al., 2002; Cock et al., 2009; Moss et al., 2011) จะเห็นได้ว่าการคัดสายพันธุ์เป็นวิธีที่สำคัญที่ช่วยลดความเสียหายในการเพาะเลี้ยงกุ้งที่เกิดจากการระบาดของเชื้อก่อโรค

ปัจจัยหนึ่งที่มีผลทำให้สิ่งมีชีวิตบางสายพันธุ์มีความสามารถในการต่อต้านการติดเชื้อได้ดีคือ ความแตกต่างทางพันธุกรรม ซึ่งมีผลให้ยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานต่อการติดเชื้อทำงานได้แตกต่างกัน ปัจจุบันมีรายงาน พบความแตกต่างในระดับการแสดงออกของยีนระหว่างสัตว์สายพันธุ์ต้านทานและไม่ต้านทานการ

เกิดโรค เช่น แกะสายพันธุ์ต้านทานและไม่ต้านทานต่อพยาธิ nematode (Diez-Tascon และคณะ 2005) วัวสายพันธุ์ต้านทานและไม่ต้านทานต่อพาราสิต *Theileria annulata* (Jensen et al., 2008) หรือ trypanosome (O'Gorman et al., 2009) และปลาแซลมอนที่ต้านทานและไม่ต้านทานต่อ *Aeromonas salmonicida* (Zhang et al., 2011) สำหรับการศึกษาในกุ้ง ได้มีรายงานการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในเม็ดเลือดของกุ้งที่ต้านทานและไม่ต้านทานไวรัสทอราในสภาวะปกติด้วยเทคนิค RNA-seq ซึ่งพบกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างสองสายพันธุ์ (Sookruksawong et al., 2013) ซึ่งการศึกษานี้ของยีนเหล่านี้โดยเฉพาะยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน และยีนในกลุ่มการรักษาสภาวะสมดุล เช่น kruppel like factor, masquerade, serine proteinase inhibitor, cathepsin C, peroxiredoxin และ integrin เป็นต้น จะทำให้สามารถเข้าใจกลไกการต้านทานไวรัสในกุ้งได้ดียิ่งขึ้น

Kruppel like factors (KLFs) พบครั้งแรกในแมลงหวี่ (Wieschaus et al., 1984; Preiss et al., 1985) KLFs เป็น transcription factor ที่ประกอบด้วยบริเวณอนุกรม Cys2/His2 Zinc finger 3 ชุดเรียงต่อกัน (Dang et al., 2000; Kaczynski et al., 2003; pearson et al., 2008) KLFs จับกับ GC- และ CACCC-boxs ของ DNA โดยเข้าทาง major groove ของ DNA (Kaczynski et al., 2003; Suske et al., 2005; Yang 1998) ระหว่าง Zinc fingers จะแทรกด้วย บริเวณอนุกรม TGEPK(Y/F)X (Dang et al., 2000) KLFs เกี่ยวข้องกับขบวนการที่สำคัญของร่างกาย เช่น proliferation, differentiation, development, cellular growth, activation และ apoptosis (Pearson et al., 2008) มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับ KLFs พบในมนุษย์จำนวนมาก และพบ KLFs อย่างน้อย 21 โปรตีน โดย KLF1 เกี่ยวข้องกับ erythropoiesis ใน erythroid cell โดยกระตุ้นการ transcript ของ β -globin ยีนผ่านการจับกับ CBP/p300 (Zhang and Bieker, 1998) ในขณะที่ KLF2, KLF8 และ KLF12 จะยับยั้งการ transcript โดยจับกับ CtBP2 ผ่านทาง PXDLS motif (Schuierer et al., 2001) ส่วน KLF4 ใน endothelial cell จะจับกับ ERK5 กระตุ้นให้เกิด vasoprotective effect ต่อต้านการอักเสบ ลดการเกิด apoptosis และลดการสร้างเส้นเลือดใหม่ (Ohnesorge et al., 2010) เป็นต้น สำหรับการศึกษา KLF ในกุ้ง มีรายงานการศึกษาในกุ้งกุลาดำและกุ้งขาว โดยพบว่าเมื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน KLF กุ้งกลุ่มนี้จะเข้าสู่สภาวะ moribund ได้ช้ากว่ากุ้งในสภาวะปกติที่ติดเชื้อ (Chang et al., 2012) และพบมีการแสดงออกของยีน IE1 และ WSSV304 ซึ่งเป็นยีนของไวรัสลดลง (Huang et al., 2014) ซึ่งให้เห็ยว่ายีน KLF มีส่วนเกี่ยวข้องกับการต้านทานไวรัส WSSV

จากความสำคัญที่กล่าวมาแล้วข้างต้น งานวิจัยนี้ สนใจศึกษาหน้าที่ของยีน Kruppel like factor ชนิดใหม่ ที่พบมีการแสดงออกน้อยในกลุ่มกุ้งสายพันธุ์ด้านทานไวรัสทอรา และหาความแตกต่างระดับจีโนมิกส์ DNA ของยีนนี้ระหว่างกุ้งสองสายพันธุ์เพื่อพัฒนาไปเป็นโมเลกุลเครื่องหมายเพื่อบ่งชี้สายพันธุ์กุ้งด้านทานไวรัสทอราต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

2.1 เพื่อศึกษาหน้าที่ของยีน Kruppel like factor ต่อการติดเชื้อไวรัสทอรา

2.2 เพื่อระบุความแตกต่างระดับจีโนมิกส์ DNA ของยีน *KLF* ระหว่างทั้งสองสายพันธุ์

3. วิธีการทดลอง

3.1 การศึกษาหน้าที่ของยีน *LvKLF*

3.1.1 สกัดจีโนมิกส์ DNA

สกัดจีโนมิกส์ DNA จากขำว้ยน้ำของกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* จากครอบครัวของกุ้งที่ด้านทานและไม่ด้านทานไวรัสทอรา ขนาด 5 กรัม ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์ตัวอย่างจากบริษัท SyAqua โดยใช้ proteinase K ย่อย และกำจัด RNA ปนเปื้อนด้วย RNase A จากนั้นจึงทำบริสุทธิ์ด้วย phenol choloform ตกตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย absolute ethanol แล้วจึงล้างตะกอนด้วย 70% ethanol หลังจากตกตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วจึงละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอและวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วย electrophotometry ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

3.1.2 สกัด total RNA

เก็บตัวอย่างอวัยวะทั้งหมด 7 อวัยวะ ได้แก่ เม็ดเลือด หัวใจ อวัยวะน้ำเหลือง ตับ ลำไส้ และก้านตา จากกุ้งขาวปกติขนาด 15 กรัม จำนวน 5 ตัว สกัด total RNA โดยใช้ TRI Reagent และกำจัด ดีเอ็นเอปนเปื้อนด้วย RQ1 DNase I เก็บ total RNA เข้า -20 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงสร้าง cDNA โดยใช้ 1 ไมโครกรัม total RNA ด้วยชุด RevertAID™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) ที่ใช้ oligod(T)

3.1.3 การหา ยีน สมบูรณ์ ของยีน *KLFs*

จากการทำ RNA-seq เปรียบเทียบระหว่างกุ้งกลุ่มด้านทานและไม่ด้านทานไวรัสทอรา (Sookruksawong et al., 2013) พบชิ้นส่วนของยีน kruppel 2 โคลนคือ kru226 และ kru272 จึงออกแบบไพร

เมอร์ให้จำเพาะกับปลายทางด้าน 5' และ 3' (ตารางที่ 1) เพื่อหาอินสมบูรณ์ของทั้งสองโคลนด้วย SMARTer RACE 5'/3' Kit (Takara) โดยทำการสร้างห้องสมุด 5' และ 3' RACE PCR แล้วจึงใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ ทำ PCR เพื่อหาปลายทางด้าน 5' และ 3' เมื่อได้ชิ้น PCR จึงโคลนเข้าสู่ Stellar competent cell (Takara) หลังจากสกัดพลาสมิดแล้วจึงหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนทั้งสอง และเปรียบเทียบยีนที่ได้กับยีนที่มีรายงานใน GenBank

3.1.4 การศึกษาการแสดงออกของยีน *LvKLF* ในเนื้อเยื่อถุงขาวสุขภาพดี โดย

ใช้เทคนิค RT-PCR

หลังจาก สร้าง cDNA จาก total RNA จาก 7 อวัยวะ ได้แก่ เม็ดเลือด เหนือก หัวใจ อวัยวะ น้ำเหลือง ตับ ลำไส้ และก้านตา ของถุงสุขภาพดีขนาด 15 กรัมจำนวน 5 ตัวแล้ว จึงใช้ cDNA ที่ได้มาเพิ่ม ปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ RT-F-KLF และ RT-R-KLF ซึ่งจำเพาะกับยีน *LvKLF* ที่ได้ออกแบบ ไว้ วิเคราะห์ PCR product ด้วย agarose gel electrophoresis วัดปริมาณ PCR product จากความเข้มของ แถบ DNA ที่บันทึกด้วยกล้อง CCD โดยใช้โปรแกรม Genetools Analysis Software (Syngene) โดยมียีน *LvEF-1α* เป็นยีนควบคุม

3.1.5 การศึกษาการแสดงออกของยีน *LvKLF* ในถุงขาวสายพันธุ์ด้านทานและ

ไม่ต้านทานไวรัสทอรา

ดูดเลือดจากถุงขาวสายพันธุ์ด้านทานและไม่ต้านทานไวรัสทอราขนาด 10 กรัม สายพันธุ์ ละ 2 ครอบครัว จากนั้นปั่นเก็บเม็ดเลือด และสกัด Total RNA ตามข้อ 3.1.2 ครอบครัวละ 25 ตัว จากนั้น จึงรวมตัว Total RNA 5 ตัวต่อกลุ่มรวม 5 กลุ่มต่อครอบครัวเพื่อเตรียม cDNA ตรวจสอบการแสดงออกของ ยีน *LvKLF* โดยใช้เทคนิค quantitative realtime RT-PCR (qRT-PCR) ด้วย Luna Universal qPCR Master Mix (NEB) และใช้ไพรเมอร์ RT-F-KLF และ RT-R-KLF และ normalize กับการแสดงออกของยีน *LvEF-1α* ในตัวอย่างเดียวกัน

3.1.6 การศึกษาหน้าที่ของ *LvKLF* ด้วยเทคนิค RNAi

สร้าง dsRNA ที่มีความจำเพาะกับยีน *LvKLF* โดยใช้ T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production Systems (Promega) โดยสร้างเส้น sense ให้ปลายทางด้าน 5' ของไพรเมอร์ Forward มีเบสจำเพาะของ T7 promoter ด้วยไพรเมอร์ T7KLF-F และ KLF-R และสร้างเส้น anti-sense ให้

ปลายทางด้าน 5' ของไพรเมอร์ Reverse มีเบสจำเพาะของ T7 promoter ด้วยไพรเมอร์ KLF-F และ T7KLF-R จากนั้นจึงทำ double strand RNA โดยการผสมเส้น sense และเส้น anti-sense ในอัตราส่วน 1:1 บ่มที่ 70 องศาเซลเซียส และค่อยๆ ลดอุณหภูมิลงเรื่อยๆ จนถึง 20 องศาเซลเซียส เมื่อได้ dsRNA แล้วจึงหาปริมาณที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการลดการแสดงออกของยีน โดยฉีด dsRNA ที่ปริมาณแตกต่างกันเข้าสู่กุ้งขาวขนาดประมาณ 3 กรัม จำนวน 3 ตัวต่อ 1 กลุ่ม โดยใช้ dGFP และ NaCl เป็นกลุ่มควบคุม ภายหลังการฉีด dsRNA นาน 24 ชั่วโมง เก็บเลือดของกุ้งทำการสกัด total RNA โดยใช้ TRI Reagent® สร้าง cDNA โดยใช้ RevertAID™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) และตรวจสอบการแสดงออกของยีน KLF โดยใช้เทคนิค RT-PCR ทำการเพิ่มจำนวนของยีน KLF ด้วยไพรเมอร์ RT-F-KLF และ RT-R-KLF และใช้การแสดงผลของยีน *LvEF-1α* เป็นยีนควบคุม

3.1.7 การศึกษาปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน LvKLF กับโปรตีนของ ไวรัสทอรา และโปรตีนอื่นของกุ้ง

3.1.7.1 การสร้าง bait plasmid (*LvKLF*pGBKT7)

สร้าง bait plasmid ที่มียีน *LvKLF* โดยเพิ่มจำนวนยีน *KLF* (1,855 เบส) และ *KLF* ส่วนที่ไม่มี Zn-finger (noZn KLF) (1,008 เบส) โดยใช้ไพรเมอร์ FY-KLF กับ RY-KLF และ F-YnoZnKLF กับ R-YnoZnKLF ตามลำดับ โคลนชิ้นดีเอ็นเอที่ได้เข้าเวกเตอร์ pGBKT7 ซึ่งเป็น bait vector ได้เป็น *Lv-KLF*/BD และ *Lv-noZnKLF*/BD และแทรนส์ฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* โดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ทำการคัดโคลนรีคอมบิแนนต์ที่สามารถเจริญได้บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะ kanamycin นำโคลนรีคอมบิแนนต์มาเลี้ยงเพิ่มจำนวนเพื่อสกัดพลาสมิด ตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนต์พลาสมิด โดยหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบสที่ถูกต้อง

3.1.7.2 การทดสอบ autoactivation และ Toxicity ของ bait plasmid

ทดสอบ autoactivation และ toxicity ของ bait plasmid โดยการแทรนส์ฟอร์ม pGBKT7-KLF และ pGBKT7-noZnKLF เข้าสู่เซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ AH109 ตามรายละเอียดใน Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System (Clontech) โดย mating กับ empty pGADT7 แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง synthetic dropout ที่ขาดกรดอะมิโน SD/-Leu/-Trp บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้น plate ลงอาหารเลี้ยงเชื้อ DS/-Leu-Trp และ SD/-Leu-Trp/-His/-Ade/x-gal ดูผลใน 7-14 วัน ถ้าเกิด

โคโลนีสีฟ้าแสดงว่า pGBKT7-KLF และ pGBKT7-noZnKLF สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ reporter gene ของยีสต์ได้ด้วยตัวเอง จึงไม่สามารถนำ pGBKT7-KLF และ pGBKT7-noZnKLF ไปศึกษาต่อได้ ดังนั้นรีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่ไม่ทำให้เกิด autoactivation จึงจะนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป หลังจากนั้นทำการทดสอบความเป็นพิษของ pGBKT7-KLF และ pGBKT7-noZnKLF โดยแทรนส์ฟอร์ม pGBKT7, pGBKT7-KLF และ pGBKT7-noZnKLF เข้าสู่เซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ AH109 เช่นเดียวกับการทำ autoactivation แต่เลี้ยงบนอาหารแข็ง SD/-trp เท่านั้น บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3-5 วัน ถ้า pGBKT7-KLF และ pGBKT7-noZnKLF ไม่เป็นพิษ ขนาดและจำนวนของโคโลนีของเซลล์ที่มีเวกเตอร์ pGBKT7, pGBKT7-KLF และ pGBKT7-noZnKLF ควรจะใกล้เคียงกัน

3.1.7.3 การศึกษาปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน LvKLF กับโปรตีนของ ไวรัสทอรา และโปรตีนอื่นของกุง

การผสมพันธุ์เซลล์ยีสต์ แทรนส์ฟอร์ม pGBKT7-KLF ที่ไม่เกิด autoactivation และ toxicity เข้าสู่เซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ AH109 จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว synthetic dropout ที่ขาดกรดอะมิโน tryptophan (SD/-trp) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C และเขย่าด้วยความเร็ว 250 rpm ข้ามคืน จนมีค่าความหนาแน่นที่ 600 nm เท่ากับ 0.8 หลังจากนั้นปั่นเก็บเซลล์ที่ 1,000 × g 5 min กระจายตะกอนด้วย SD/-trp ประมาณ 4-5 mL ได้เป็น bait strain (Lv-KLF/BD) นำ Lv-KLF/BD ไปผสมกับ TSV/pGADT7 และ LV/pGADT7 ซึ่งอยู่ใน Y187 แล้วตามลำดับ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง SD/-Leu-Trp 3-5 วัน จากนั้นจึงเลี้ยงลง อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง SD/-Leu-Trp/-His/-Ade คูณผล 2 อาทิตย์ จากนั้นลงเชื้อที่ขึ้นใน SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade ใน SD/-Leu-Trp broth เลี้ยง 3 วัน จากนั้นสกัดดีเอ็นเอซึ่งมีทั้ง BD และ AD transform เข้า *E. coli* เพื่อ screen เอา pGADT7 ทำการสกัด plasmid เพื่อยืนยันการจับกับ LvKLF/BD ผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์นำมา BLAST เพื่อเปรียบเทียบกับยีนที่มีรายงานใน GenBank และวิเคราะห์โดเมนต่าง ๆ ด้วยโปรแกรม SmartTM databases (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)

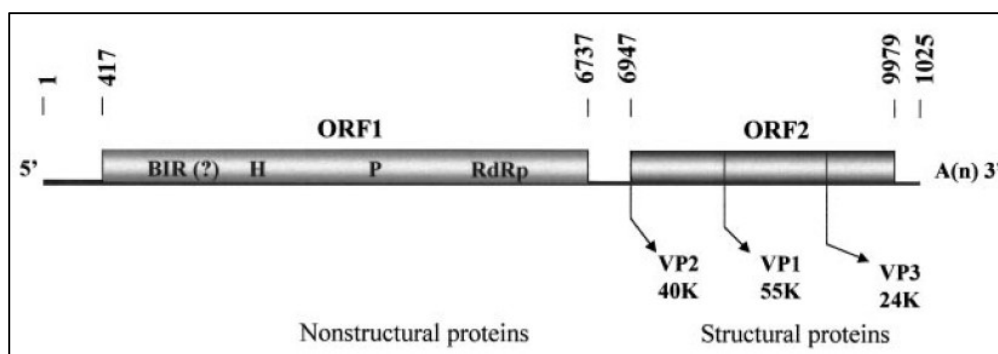
3.1.8 การผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ LvKLF และทำบริสุทธิ์

สร้างพลาสมิดรีคอมบิแนนท์โดยการโคลนชิ้นยีน KLF เข้าสู่เวกเตอร์ pET17b และ pKPVR600 โดยให้โปรตีนรีคอมบิแนนท์ที่ได้มี His-tag อยู่ปลายทางด้านคาร์บอกซิลและด้านอะมิโนตามลำดับ โดยใช้ไฟเมอร์ KLF-KpnI กับ KLF-EcoRV และ KLF-Sac-H กับ KLF-NotI (ตารางที่ 1) จากนั้น transform เข้าสู่ *E. coli* หลังจากสกัด plasmid หาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อตรวจสอบความถูกต้อง เมื่อได้โคลน

ที่ถูกต้องแล้วจึงย้ายพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ที่ได้เข้าสู่เซลล์ *E. coli* Rosetta ผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์โดยชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีนด้วย IPTG และตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ด้วย SDS-PAGE และย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue ทำการแยกโปรตีนรีคอมบิแนนท์ให้บริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA column สะโปรตีนรีคอมบิแนนท์ออกจาก column ด้วย imidazole ความเข้มข้นต่างๆ ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยการทำ western blot ที่ใช้ antibody ตัวแรกเป็น anti-His-tag และ antibody ตัวที่สองเป็น goat-anti-mouse IgG

3.1.9 การผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ของไวรัสทอรา และทำบริสุทธิ์

ออกแบบไพรเมอร์ให้สัมพันธ์กับยีนทั้ง 7 ของไวรัสทอรา ได้แก่ BIR-like sequence (BIR), helicase (H), protease (P), RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), Vp1, VP2 และ VP3 (รูปที่ 1) โดยใช้ไพรเมอร์ของแต่ละยีนตามตารางที่ 2 โดยสร้าง first strand cDNA จาก RNA ของกุ่มที่ติดไวรัส TSV หลังจากทำบริสุทธิ์ PCR product ของชิ้นยีนไวรัสแล้ว จึงโคลนเข้าสู่ plasmid pVR600 เมื่อ transform เข้าสู่ *E. coli* หลังจากสกัด plasmid หาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อตรวจสอบความถูกต้อง เมื่อได้โคลนที่ถูกต้องแล้วจึงย้ายรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้เข้าสู่เซลล์ *E. coli* R BL21 codon plus ผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์โดยชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีนด้วย IPTG และตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ด้วย SDS-PAGE และย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue



รูปที่ 1 การจัดเรียงตัวของยีนต่างๆบนจีโนมของไวรัสทอรา ซึ่งประกอบด้วย 2 ORFs โดย ORF ที่ 1 ประกอบด้วยยีน BIR-like sequence (BIR), helicase (H), protease (P) และ RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) และ ORF ที่ 2 ประกอบด้วยยีน VP1, Vp2 และ VP3 (Mari และคณะ 2002)

3.2 การระบุความแตกต่างระดับจีโนมิกส์ DNA ของยีน KLF ระหว่างทั้งสองสายพันธุ์

3.2.1 การศึกษาการจัดเรียงตัวของ LvKLF

สร้างห้องสมุดจีโนม 4 ชนิดด้วยการตัดจีโนมิกส์ด้วยเอนไซม์ *EcoRV* *DraI* *PvuII* และ *SspI* จากนั้นออกแบบไพรเมอร์ให้สัมพันธ์กับปลายด้าน 5'UTR (1w1LvKr272 และ 1w2LvKr272 ตารางที่ 2) ทำ PCR กับห้องสมุดจีโนมทั้ง 4 ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้และไพรเมอร์จาก kit AP1 และ AP2 ตามลำดับ เมื่อได้ชิ้น PCR จึงโคลนเข้าสู่ pGEM-T easy vector สกัด plasmid และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ออกแบบไพรเมอร์ (2w3LvKr และ 2w4LvKr ตารางที่ 2) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 5'UTR เพิ่มมากขึ้น จากนั้นวิเคราะห์ putative promoter และ transcription start site ของยีน KLF ด้วย the Neural network promoter prediction (http://www.fruit.org/seq_tools/promoter.html) และ Alibaba2 Version 2.1 TRANSFAC 4.0(<http://gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>)

3.2.2 การระบุตำแหน่ง SNP

ออกแบบไพรเมอร์ในแต่ละส่วนของ intron และ exon ที่ได้ (IT-1F, IT-1R, IT-2F, IT-2R, IT-3F และ IT-3R, ตารางที่ 2) ทำ PCR ด้วยไพรเมอร์แต่ละช่วงโดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอของกุ้งขาวสายพันธุ์ ต้านทานและไม่ต้านทานไวรัสทอรา หลังจากทำปฏิกิริยาริซขึ้น PCR product แล้วจึงโคลนเข้าสู่ T&A cloning vector สกัดพลาสมิด และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่าง ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในแต่ละช่วงเพื่อระบุตำแหน่งที่อาจจะเป็น SNP

3.2.3 การตรวจสอบความสัมพันธ์ของ SNP กับสายพันธุ์การต้านทานไวรัสทอรา

ออกแบบไพรเมอร์ให้สัมพันธ์กับ SNP ที่สนใจ โดยให้ปลายทางด้าน 3' ของไพรเมอร์ให้มีเบสตาม SNP ที่เกิดขึ้น และเบสตำแหน่งที่ 3 หรือ 4 จากปลายด้าน 3' ให้ออกแบบให้ผิดจากเบสที่ถูกต้อง ดังตารางที่ 2 จากนั้นจึงปรับสภาวะการทำ PCR ให้เหมาะสมกับการตรวจสอบความสัมพันธ์ โดยเมื่อทดสอบไพรเมอร์ที่ตรงกับโคลนที่มี SNP ตรงกันในช่วง 3.2.2 จะมี PCR product เกิดขึ้น ในขณะที่ไพรเมอร์ที่บริเวณ

SNP ไม่ตรงกับโคลนในข้อ 3.2.2 จะไม่พบ PCR product เกิดขึ้น เมื่อได้สภาวะเหมาะสมในการทำ PCR แล้ว จึงทดสอบประสิทธิภาพของ SNP ว่ามีความสัมพันธ์กับสายพันธุ์การต้านทานหรือไม่ต้านทานไวรัสหรือไม่

ตารางที่ 1 รายละเอียดของไพรเมอร์สำหรับการศึกษายีนสมบูรณ์ การแสดงออกของยีน ปฏิสัมพันธ์โปรตีน LvKLF และโปรตีนของไวรัส และการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน

ชื่อไพรเมอร์	ไพรเมอร์	งานที่ใช้
3RACE-226	GATTACGCCAAGCTTATCTGTGATCGCGCCTTCGAGCACTCTG	3' RACE
3RACE-272	GATTACGCCAAGCTTAGTGTGAGGTGAGTGGATGCGAGGATTC	3' RACE
5RACE-272	GATTACGCCAAGCTTAACAAGCTTCCGACAACACTGCCAACAC	5' RACE
RT-F-KLF	ACATACCCGTCGATGAAGTC	RT, qRT-PCR
RT-R-KLF	TTCCTCGCCACCCGAATTTG	RT, qRT-PCR
LvEF-F	CTTGATTGCCACACTGCTCAC	RT, qRT-PCR
LvEF-R	TCTCCACGCACATAGGCTTG	RT, qRT-PCR
T7KLF-F	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGAGCCCTGCTCAAGCC	RNAi
T7KLF-R	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGTTGTAGTCCTCGGG	RNAi
KLF-F	GAGCCCTGCTCAAGCCGAAAG	RNAi
KLF-R	GTTGTAGTCCTCGGGAGTTCTG	RNAi
T7-KLF-F2	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGGTACGTCAGCGATGACAG	RNAi
T7-KLFR2	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCTACGAGGGAAGGGTAGA GAC	RNAi
KLF-F2	GGGTACGTCAGCGATGACAG	RNAi
KLF-R2	GCTACGAGGGAAGGGTAGAGAC	RNAi
FY-KLF	ATATAACCCGGGT-GCCATGATGCCCCAGGGAAT	Y2H
RY-KLF	ATCGGCCTGCAG-CTAGCAGTAGTGAAGGAACT	Y2H
F-YnoZnKLF	ATATAACCCGGGT-AGCCAAGAGCCCTGCTCAAG	Y2H
R-YnoZnKLF	ATCGGCCTGCAG-CTAGCAGTAGTGAAGGAACTC	Y2H
KLF-KpnI	GCCGGGTACCGGCCATGATGCCCCAGGG	cloning
KLF-EcoRV	CGGCGATATCCTAATGATGATGATGATGATGGCAGTAGTGAAGG AACTCGG	cloning
KLF-Sac-H	ATTCGAGCTCCCACCACCACCACCACCACGCCATGATGCCCCA GGGAAT	cloning
KLF-NotI	GATTGCGGCCGCGCTAGCAGTAGTGAAGGAACTC	cloning
BIR-F	ATATTGCCATGGTCCCATATCACACTATAGGAGTTTCAGGAAAT	cloning
BIR-R	CATATCCTCGAGACACAACAACACATAATTACGTGCCACTA	cloning
F-Helicase	ATATTGCCATGGTCTGTACATGTATGGTGATGCTGGGTGTGGC AAAAC	cloning

R-Helicase	CATATCCTCGAGTACGTTTGAGGTTGCAAAAACAAAAG	cloning
F-Protease	ATATTGCCATGGTCCCAGGATCAAGTCTATATACACAT	cloning
R-Protease	CATATCCTCGAGTGTGCGCGTGGCGGCCATTA	cloning
F-RNAP	ATATTGCCATGGTTCGAGAAAATCGTGGACAAGGCCAAG	cloning
R-RNAP	CATATCCTCGAGCTCCACATGCACATATCTTCA	cloning
F-VP1	ATATTGCCATGGTCTGGCGTGGAAATATTAACCTTAATC	cloning
R-VP1	CATATCCTCGAGATGTGTGGATGGATATATACATGGAGAT	cloning
F-VP2	ATATTGCCATGGTTCGCTAACCCAGTTGAAATTGATAA	cloning
R-VP2	CATATCGCGGCCGCAAATCCGAACATTGAAGCTACA	cloning
F-VP3	ATATTGCCATGGTTCGCTGGTCTGGACTACTCCAGCTCAG	cloning
R-VP3	ATATCCTCGAGAGCCAATTCGGCAGGTC	cloning

ตารางที่ 2 รายละเอียดไพรเมอร์สำหรับการศึกษาการจัดเรียงตัวของ *LvKLF* การระบุและการศึกษาประสิทธิภาพของ SNP

1w1LvKr	TGCCAGAGTGCTCGAAGGCGCGATCACA	Genome walk
1w2LvKr	AGTGCTCGAAGGCGCGATCACAGATA	Genome walk
2w3LvKr	TTAGCTGATCAATGTTCTGCTCCTCTT C	Genome walk
2w4LvKr	TGGGCGGCATGTGTTGGTAGCCGTGTTC	Genome walk
IT-1F	ACGCTTGTTTATGACTGTTG	Searching SNP
IT-1R	TCTCATCCACGGTGTGCTT	SNP identifying
IT-2F	CAAGGAAGACTGTTCTGGTTAG	SNP identifying
IT-2R	GCAGAGGGTATTCGTATCTATTC	SNP identifying
IT-3F	TTCTTCATTCCAGGTTTGCGG	SNP identifying
IT-3R	CGACGGGTATGTGAGGGTGC	SNP identifying
Intron1-FA	TTAACACCAAGGCGGATCAAA	SNP
Intron1-FG	TTAACACCAAGGCGGATCAAG	SNP
Intron1-R	GAGCAACAACGGCGTAAG	SNP
IT-1-XA	TTAACACCAAGGCGGATCTAA	SNP
IT-1-XG	TTAACACCAAGGCGGATCTAG	SNP
IT-1-gXA	TTAACACCAAGGCGGATCGAA	SNP
IT-1-gXG	TTAACACCAAGGCGGATCGAG	SNP
IT-1-4XA	TTAACACCAAGGCGGATGAAA	SNP
IT-1-4XG	TTAACACCAAGGCGGATGAAG	SNP
Intron2-FT	CTTGAATTATTATGTGCGTGCTG	SNP
Intron2-FA	AATTATTATGTGCGTGCAAG	SNP
Intron2-R	AGTGGAACAGTAAATGAATG	SNP

IT-2-0TG	GAATTATTATGTGCGTGCTGAA	SNP
IT-2-CAAG	GAATTATTATGTGCGTGCAAG	SNP
IT-2-aCTGA	GAATTATTATGTGCGTACTGA	SNP
IT-2-tCA	GAATTATTATGTGCGTTCA	SNP
IT-2-tCT	GAATTATTATGTGCGTTCT	SNP
1w1LvKr	TGCCAGAGTGCTCGAAGGCGCGATCACA	Genome walk
1w2LvKr	AGTGCTCGAAGGCGCGATCACAGATA	Genome walk

4. ผลการทดลอง

4.1 การหายีนสมบูรณ์ของยีน *LvKLF* และลักษณะสมบัติของ *LvKLF*

จากรายงานการศึกษาการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในเมดเลือดกุ้ง ระหว่างกุ้งสายพันธุ์ด้านทานและไม่ด้านทานไวรัสทอราในสภาวะปกติด้วยเทคนิค RNA-seq พบยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน มีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหลายยีน โดยพบ Kru226 และ kru272 (รูปที่ 2) เหมือนกับส่วนของยีน kruppel like factor (Sookruksawong et al., 2013) ซึ่งมีการแสดงออกของยีนทั้งสองในกุ้งสายพันธุ์ที่ไม่ด้านทานไวรัสทอราสูงกว่ากุ้งสายพันธุ์ด้านทานไวรัส ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาหน้าที่ของยีน *LvKLF* ต่อการติดเชื้อไวรัสทอรา

```
>226
GAGAGAGCGATGGCCATGATGCCCCAGGGAATGGCGGTGCGGCCATACACAGCGGGGCCACCTCCTGCGCCC
ATGGATGTAGAACACGGCTACCAACACATGCCGCCCATGCACCCGAGCCCCACCCACAGTCTCACCCACAG
CCCCATCACAGCCGAGACACAGCCGAGTACCCACCAAGTCAAGCTCAGGCCCCGCTCCTGTCGAA
GAGGAGCAGAACATTGATCAGCTAATGGTCGGGTGCGAGCCCGGTACGAGTGTAATCTGCGGGAAGGGT
TTCGCTATCCCAGCGCGCTCCAGCGGCACCCAGTTCACACGGGAGAAAAACCTTTAAGTG

>272|
GTATCCACACCAAGGAGCGCCCTTACAAGTGTAATATCTGTGATCGCGCCTTCGAGCACTCTGGCAAACCTCC
ACCGCCATATGAGGACCCATACAGGGGAAAGCCCCATAAGTGTGAGGTGAGTGGATGCGAGGATTCTCTTA
ACATTTCCGTGTCAGTAATGCATAAATGTTGGTTATAGTAAGCTGTGTTGGCAGTTGTCGGAAGCTTGTT
TGTTTGATTTTCTGTAATAGTGTGTATCATATATTTAATGTATTGTTTTTCTTCATTCAGGTTTGCGG
AAAGACATTCGTGCAGTCTGGTCAGCTCGTGATCCACATGAGAGCCACACTGGAGAGAAGCCATACACCTG
TGAATACTGCCAGAAAGGTTTCACCTGCTCCAAGCAATTGAAGGTTACATCCGTACCCACACAGGAGAAAA
ACCCATGAATGCGACGTGTGCGGAAAACCTTTGGCTACAACCAGTACTCAAGATGCACAAGATGTCTCA
TCTCGGTGAAAAGCTTTACAAATGTAATCTGTGTGAGGAATCTTCTCTCACGCAAGTCTCTGGACCGCCA
CATCCGTGACCACAGCCAAGAGCCCTGCTCAAGCCGAAAGCAGCAGCCCGCAAGCAGGCCGAGCCTCGGCA
GCAATGGCAAACATCATCTCTGCAATGACTGCCACAGATTCAGCTCCATTCTCCCCACCAACTCCTC
CCCCACCAACTCTTCTCTCCAGCTTCAGTATCTTGGGATAGTGAGTCTGCGGAGCAACAGTTGCCGTTTCG
TGAGTTTCGAAGACCATCGGAAGGGCAGTCGCCAGCGGACCTGAAGTGTAACCTTGTCCAGGATACGACAA
CATCGGCTCTGATCTCCTGGGTACGTACGGATGACAGCGGTCGAGGAGCTAGCCCCGTGAGCGACACTCT
CTCCCCACCTAGATC
```

รูปที่ 2 Kru226 และ Kru272 ที่รายงานโดย Sookruksawong et al., 2013 ซึ่งพบมีการแสดงออกต่ำในกุ้งด้านทานไวรัสทอรา

เมื่อทำการหาลำดับเบสของ *LvKLF* จาก Kru226 และ Kru272 ด้วยเทคนิค 5'และ

3'RACE พบว่า Kru226 และ Kru272 ที่รายงานโดย Sookruksawong et al., 2013 จากการทำ RNA-seq เป็น

ส่วนของยีนเดียวกัน โดย Kru272 มีส่วนของ intron ขนาด 279 เบส และ 161 เบสแทรกเข้ามาดังรูปที่ 3

ตามลำดับ

Kru226 VS Kru272

```
Kru226 -----ACATGGGGA
Kru272 GCATGAGAGGCTACATTCACCTGGTGGGAGACCTGTGCTTGTTCCTATTTCATTCATT
      ***
Kru226 GATGGAAGCTACTGCGCTTGTGTGAACCCATAGCATATATGTGAACC-CGATTCCTGGGGG
Kru272 TACTGTTCCTCACTACATATGTTAATTCACAGGATTCCTCCTTGGGATGAATATAGCAA
      * * * * *
Kru226 AACACATAGTTCTGTTCCGATGTCGA--AGCAGTGAGCTTACCAGCGTAGAAGCTTA-CTC
Kru272 GGCCAAGGACAGTACGAT-ATGTGAATTATGGTAATTAATTAATTAATACCTTGGCTC
      * * * * *
Kru226 TAGAGAACTCAGTTCTCAACATAGTGCAATTGTTACC-CAGCAA-ATACTAGTGCAATG
Kru272 CTCATGATCAATGGACCCAGCATTATATT-TTGTGTGTCACGACAGGACAGGAATAGATAC
      * * * * *
Kru226 GATCTACTTGTGCTAATATCAAGTCCATATACATTCGTGTACAAGGA---AGACT-----
Kru272 GAATACCTCTGTC-AGTCGCAAG-CAGACTCGCTTAAATCCAAGGATGGTAAACTAAGCC
      ** * * * * *
Kru226 -----GTTC-----GAGAGAGCGATGGCCATGATGCCCCAGGGAATGGCGGTGCGG
Kru272 CCAACGTTTTCCTCCACAGAGAGCGGATGGCCATGATGCCCCAGGGAATGGCGGTGCGG
      *** *
Kru226 CCATACACAGCGGGGCGCACCTCCTGCGCCCATGGATGTAGAACACGGCTACCAACACATG
Kru272 CCATACACAGCGGGGCGCACCTCCTGCGCCCATGGATGTAGAACACGGCTACCAACACATG
      *****
Kru226 CCGCCCATGCAACCGCAGCGCCACCCACAGTCTCACCCACAGCCCATCACCAGCCGCGAG
Kru272 CCGCCCATGCAACCGCAGCGCCACCCACAGTCTCACCCACAGCCCATCACCAGCCGCGAG
      *****
Kru226 ACACAGCCGCGATACCCACAGTCAAGCTCAGGCCCCCGCTCCTGTGCAAGAGGAG
Kru272 ACACAGCCGCGATACCCACAGTCAAGCTCAGGCCCCCGCTCCTGTGCAAGAGGAG
      *****
Kru226 CAGAACATTGATCAGCTAATGGTGGGTCGGGTCGGAGCCGCGGTACGAGTGTAAATCTGCGGG
Kru272 CAGAACATTGATCAGCTAATGGTGGGTCGGGTCGGAGCCGCGGTACGAGTGTAAATCTGCGGG
      *****
Kru226 AAGGGTTTCGCTATCCAGCGCGCCTCCAGCGGCACACCGAGTTCACACGGGAGAAAAA
Kru272 AAGGGTTTCGCTATCCAGCGCGCCTCCAGCGGCACACCGAGTTCACACGGGAGAAAAA
      *****
Kru226 CCCTTTAAGTG-----
Kru272 CCCTTTAAGTGAGTATCGCCCCCTCGGTTGTCCCTCTTGCAAGTATGAGTGACCAATATTAA
      *****
Kru226 -----
Kru272 CTTAAGTGATTTAGTATTAGTATAGTGACATCAATAGAAATGCGACTGACTCATGGATAA
      -----
Kru226 -----
Kru272 TACAGTAATAGGACTCGCTTAAGCACATGCAGTTTGGTCTAAATATATTTCTTTGAGCA
      -----
Kru226 -----
Kru272 AAGCAACTGATTAAACAAGTAGTTTAGAGGAAAGATTTAGAAATATGAGCTTGTCTGTA
      -----
Kru226 -----CGAATTCCTGC
Kru272 ACATCCTTTGGTCGTGGAACATAAATAATTTTCTTCACTCAACAGGTGCGAATTCCTGC
      *****
Kru226 GACAAGACGTTTAGTGTCAAGGAAAACCTGAACGTGCACCGCCGTATCCACACCAAGGAG
Kru272 GACAAGACGTTTAGTGTCAAGGAAAACCTGAACGTGCACCGCCGTATCCACACCAAGGAG
      *****
Kru226 CGCCCTTACAAGTGTAATATCTGTGATCGCGCCTTCGAGCACTCTGGCAAACTCCACCGC
Kru272 CGCCCTTACAAGTGTAATATCTGTGATCGCGCCTTCGAGCACTCTGGCAAACTCCACCGC
      *****
Kru226 CATATGAGGACCCATACAGGGGAAAGGCCCATAGTGTGAGGT-----
Kru272 CATATGAGGACCCATACAGGGGAAAGGCCCATAGTGTGAGGTGAGTGGATGCGAGGAT
      *****
Kru226 -----
Kru272 TCTCTTAACATTTCCGTGTCCAGTAATGCATAAAATGTTGGTTATAGTAAGCTGTGTTGG
      -----
Kru226 -----
Kru272 CAGTTGTGCGAAGCTGTTTGTGTTGATTTCTTGTAATAGTGTGTGATCATATATTAA
      -----
Kru226 -----TTGCGGAAAGACATTCGTGCAGTCTGGTCAGCTCG
Kru272 TGTATTGTTTTTCTTCATTCAGGTTTGGCGGAAAGACATTCGTGCAGTCTGGTCAGCTCG
      *****
```

Kru226	TGATCCACATGAGAGCCACACTGGAGAGAAGCCATACACCTGTGAATACTGCCAGAAAG
Kru272	TGATCCACATGAGAGCCACACTGGAGAGAAGCCATACACCTGTGAATACTGCCAGAAAG
Kru226	*****
Kru226	GTTTCACCTGCTCCAAGCAATTGAAGGTTTCACATCCGTACCCACACAGGAGAAAAACCTT
Kru272	GTTTCACCTGCTCCAAGCAATTGAAGGTTTCACATCCGTACCCACACAGGAGAAAAACCTT
Kru226	*****
Kru226	ATGAATGCGACGTGTGCGGAAAAACCTTTGGCTACAACCACGTACTCAAGATGCACAAGA
Kru272	ATGAATGCGACGTGTGCGGAAAAACCTTTGGCTACAACCACGTACTCAAGATGCACAAGA
Kru226	*****
Kru226	TGTCTCATCTCGGTGAAAAGCTTTACAAATGTACTCTGTGTGAGGAATTCTTCTCCTCAC
Kru272	TGTCTCATCTCGGTGAAAAGCTTTACAAATGTACTCTGTGTGAGGAATTCTTCTCCTCAC
Kru226	*****
Kru226	GCAAGTCTCTGGACCGCCACATCCGTGACCACAGCCAAGAGCCCTGCTCAAGCCGAAAGC
Kru272	GCAAGTCTCTGGACCGCCACATCCGTGACCACAGCCAAGAGCCCTGCTCAAGCCGAAAGC
Kru226	*****
Kru226	AGCAGCCCGCCAAAGCAGGCCGAGCCTCGGCAGCAATGGCAAACATCATCTCCCTGCAATGA
Kru272	AGCAGCCCGCCAAAGCAGGCCGAGCCTCGGCAGCAATGGCAAACATCATCTCCCTGCAATGA
Kru226	*****
Kru226	CTGCCACAGATTCCAGCTCCCATTCCTCCCCACCAACTCCTCCCCACCAACTCTTCCT
Kru272	CTGCCACAGATTCCAGCTCCCATTCCTCCCCACCAACTCCTCCCCACCAACTCTTCCT
Kru226	*****
Kru226	CTCCAGCTTCAGTATCTTGGGATAGTGAGTCTGCGGAGCAACAGTTGCCGTTTCGTGAGT
Kru272	CTCCAGCTTCAGTATCTTGGGATAGTGAGTCTGCGGAGCAACAGTTGCCGTTTCGTGAGT
Kru226	*****
Kru226	TTCGAAGACCATCGGAAGGGCCAGTCGCCAGCGGACCTGAAGTGTACACTTGTCCAGGAT
Kru272	TTCGAAGACCATCGGAAGGGCCAGTCGCCAGCGGACCTGAAGTGTACACTTGTCCAGGAT
Kru226	*****
Kru226	ACGACAACATCGGCTCTCGATCTCCTGGGTACGTCAGCGATGACAGCG-----
Kru272	ACGACAACATCGGCTCTCGATCTCCTGGGTACGTCAGCGATGACAGCGCGGTCGAGGAGCTA
Kru226	*****
Kru226	-----
Kru272	GCCCCGTCAGCGACACTCTCTCCCCACCTAGATC

รูปที่ 3 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการทำ RACE ของ Kru226 และ Kru272 แถบเขียวแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Kru226, ตัวอักษรสีน้ำเงินและสีแดง แสดง Kru272 จากรายงานที่ผ่านมามาตามลำดับ โดยที่ (Sookruksawong et al., 2013) อักษรสีน้ำเงินคือส่วนของ intron

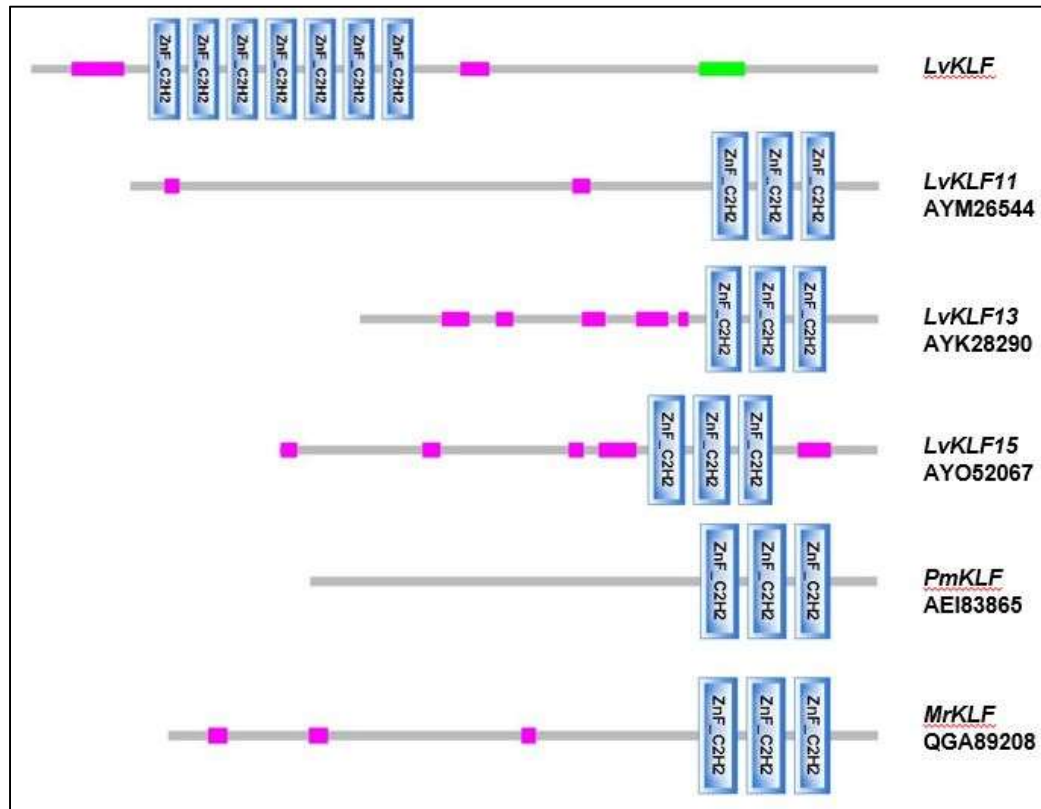
เมื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *LvKLF* พบว่า ยีน *LvKLF* ประกอบด้วย 2,070 เบส มี ORF ขนาด 1,830 เบสถอดรหัสได้เป็นโปรตีนขนาด 610 อะมิโน มีปลาย 5' และ 3' UTR ขนาด 240 และ 305 เบส ตามลำดับ (รูปที่ 4) โดยโปรตีน *LvKLF* ประกอบด้วย ZnF_C2H2 แบบ CX₂CX₁₂HX₃H ทั้งหมด 7 domain แต่ละ domain เชื่อมด้วยกรดอะมิโนนอร์รักันซ์ 5 ตัว TGE(K/R)P โดย ZnF_C2H2 เรียงตัวทางปลายด้านอะมิโน ซึ่ง *LvKLF* isoform อื่นที่มีรายงานในกุ้งขาว (*LvKLF11*, *LvKLF13* และ *LvKLF15*) กุ้งกุลาดำ (*PmKLF*) และกุ้งก้ามกราม (*MrKLF*) จะประกอบด้วย ZnF_C2H2 domain เพียง 3 domain และอยู่บริเวณปลายด้านคาร์บอกซิลของโปรตีน (รูปที่ 5)

AGATGGAAGCTACTGCGCTTGTGTGAACCCATAGCATATATGTGAACCCGATTCTGGGGGAACACATAGTTCTGT
 TCCGATGTCGAAGCAGTGAGCTTACCAGCGTAGAACTTACTCTAGAGAACTCAGTTCTCAACATAGTGCAATTG
 TTACCCAGCAAATACTAGTGCATTGGATCTACTTGTGCTAATATCAAGTCTTACATTCGTGTACAAGGAAGAG
 TGTCTGTGAGAGAGCGATGGCCATGATGCCCCAGGGAATGGCGGTGCGGCCATACACAGCGGGGCCACCTCTCGC
 M A M M P Q G M A V A P Y T A G P P P A
 CCCATGGATGTAGAACACGGGTACCAACACATGCCGCCATGCACCCGACGCCCCACCCACAGTCTCACCCACAG
 P M D V E H G Y Q H M P P M H P Q P H P Q S H P Q
 CCCCATCACCAGCCGAGACACAGCCGAGTACCCACAGTCAAGCTCAGGCCCCGCTCTGTGCGAAGAG
 P H H Q P Q T Q P Q Y P P V M Q A Q A P A P V E E
 GAGCAGAACATTGATCAGCTAATGGTCGGGTGCGAGCCGCCGTACGAGTGTAATAATGCGGGGAAGGGTTTCGCT
 E Q N I D Q L M V G S E P P Y E C K I C G K G F A
 ATCCAGCGCGCTCCAGCGGCACCCGAGTTCACACGGGAGAAAAACCCTTAAGTGCGAATTCTGCGACAAG
 I P A R L Q R H H R V H T G E K P F K C E F C D K
 ACGTTTAGTCAAGGAAAACCTGAACGTCACCGCGTATCCACCAAGGAGCGCCCTTACAAGTGTAATATC
 T F S V K E N L N V H R R I H T K E R P Y K C N I
 TGTGATCGCGCTTCGAGCACTCTGGCAAATCCACGCCATATGAGGACCCATACAGGGGAAAGGCCCATAG
 C D R A F E H S G K L H R H M R T H T G E R P H K
 TGTGAGGTTTGCAGGAAGACATTCTGTCAGTCTGGTCAGCTCGTGATCCACATGAGAGCCACATGAGAGAA
 C E V C G K T F V Q S G Q L V I H M R A H T G E K
 CCATACACCTGTGAATACTGCCAGAAAGGTTTACCTGTCTCAAGCAATTGAAGGTTACATCCGTACCCACACA
 P Y T C E Y C Q K G F T C S K Q L K V H I R T H T
 GGAGAAAAACCTATGAATGCGAGTGTGCGGAAAAACCTTTGGCTACAACACGCTACTCAAGATGCAAGATG
 G E K P Y E C D V C G K T F G Y N H V L K M H K M
 TCTCATCTCGGTGAAAGCTTTACAAATGTACTCTGTGTGAGGAATTCTTCTCTCACGCAAGTCTCTGGACCGC
 S H L G E K L Y K C T L C E E F F S S R K S L D R
 CACATCCGTGACCAAGCCAGCCCTGCTCAAGCCGAAAGCAGCAGCCCGCCCAAGCAGGCGCGCTCGGCAG
 H I R D H S Q E P C S S R K Q Q P A K Q A E P R Q
 CAATGGCAAACATCTTCTCTGCAATGACTGCCACAGATTCCAGCTCCCATCTCTCCCCACCAACTCTCTCCCC
 Q W Q T S S P A M T A T D S S S H S S P T N S S P
 ACCAQTCTTCTCTCCAGCTTCAGTATCTTGGGATAGTGAGTCTGCGGAGCAACAGTTGCGGTTCTCGTGAATT
 T N S S S P A S V S W D S E S A E Q Q L P F R E F
 CGAAGACCATCGGAAGGGCCAGTCGCGCAGCGGACCTGAAGTGACACTTGTCCAGGATACGACAACATCGGCTCT
 R R P S E G P V A S G P E V Y T C P G Y D N I G S
 CGATCTCTGGGTACGTCAGCGATGACAGCGGTGAGGAGCTAGCCCCGTGACGACACTCTCTCCCCACCTAGA
 R S P G Y V S D D S G R G A S P V S D T L S P P R
 TCTCCAATCACTTCTGGACCTCTCTAAATACCCAGCTGCCACAACCTCCTCATATCATTGATGCCCCGCCCATG
 S P I T S G P P L N T Q L P Q P P H I I D A P P M
 GCGCCACGAACCTCCGAGGACTACAACATGTTCTGCGGCGTCTCTACCTTCCCTCGTAGTACCTAAGCCCGAG
 A P R T P E D Y N M F L R R L Y P S L V V P K P E
 CCCTCGCGCTTCGACAACAGCGAATGGCAGTCTTCACCACAGAAACGGGAGAGAGATTTCATGCCCTTATGAT
 P S R F D N Q R M A V F T T E T G E R V S C P Y D
 CTCCTGCTTGCACTGCAAGGAAACAAAAGCATGTATCTGGAACAAAGATGGCTGAACAGGAAGTCTCCGTCGG
 L L L A L Q G N K S M Y L E Q R M A E Q E A L R R
 CAGCAGCAGCTAGAGAACATTACATGCGGAGGAGACTCGCCGAGGCGCGAAGCTGTTTTTTGAAACC
 Q Q Q Q L E E H Y M R E E T R R R R E A A F F E T
 GTCGAGCGCGTCTGAAGGCATTGTGGGCAAGGAAAGGCTCGAGCGGCTAGGGCACCTTACATACCCGTCGAT
 V E R V L K A L V G K E R L E R L G H P H I P V D
 GAAGTCTTCATGAAAACATAACCCCTCATGGGATCCCAACCATGCAAGGAGCCCTCCCTGTACGCGATGGACCGC
 E V L M K T I T L M G S Q P C K E P S L Y A M D R
 ATCAAGGTGAACCTGCGGCTCCTGCGGAGTGCGAGCGTCCCCGACCAGACCATGTGGGTCAAATTCGGGTGGCGA
 I K V N L R L L P E C S V P D Q T M W V K F G W R
 GGAAAGCCCATCGAGGAGATCGTGGCCGAGTTCCTTCACTACTGCTAGCAAGGGTGTGCAAGGAGCGGCCCT
 G K P I E E I V A E F L H Y C *
 ACCGTCGCTTGAATCTTAGCAGCTGGTTTCGTGCTCACTTCCCATTTCTCATCTTGTCTCAGTATTTTTATGTTAC
 CTTATAGTGTGAAGCTATCACTCTAGTCGTCAGTGGATCGCTGTCCACTTTTTATGTTGAAGCATCCATTTGT
 ATAGTCTGTTTATTTAATGCACAATGAATAGTTCAAATTAATTATGTTGAGAAATGTAAAGATGAATATACAT
 ATATTTTGAATGTACTGTTTATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

รูปที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน *LvKLF* ซึ่งประกอบด้วย ZnF_C2H2 domain 7 domain

ทางปลายด้านอะมิโน แสดงด้วยแถบสีเหลือง start codon แสดงด้วยแถบสีเขียว และ stop codon แสดงด้วย

(*)



รูปที่ 5 แบบจำลองการเรียงตัวของ ZnF_C2H2 domain ของยีน KLF isoform ต่างๆจากกุ้ง *Litopenaeus vannamei* (LvKLF, LvKLF11, LvKLF13 และ LvKLF15) กุ้ง *Penaeus monodon* (PmKLF) และกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* (MrKLF) กล้องสี่ชมพูปแสดงบริเวณ low complexity

เมื่อเปรียบเทียบกับ KLF จากกลุ่ม crustacean ได้แก่ กุ้ง red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*), Amphipoid (*Hyalella azteca*), ปู swimming crab (*Portunus trituberculatus*) กลุ่ม Arthropod ได้แก่ ผีเสื้อ orchid (*Eufriesea mexicana*), ผีเสื้อ bumblebee (*Bombus terrestris*), ผีเสื้อ (*Bombus vancouverensis nearcticus*), mountain pine beetle (*Dendroctonus ponderosae*) กลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลัง ได้แก่ ปลา (*Fundulus heteroclitus*, *Danio rerio*) และ คน (*Homo sapiens*) พบว่า KLF ที่รายงานในสัตว์มีกระดูกสันหลัง พบ ZnF_C2H2 domain 3 domain ในขณะที่ KLF ของกลุ่ม crustacean และ arthropod พบ ZnF_C2H2 domain 3, 4, 7 และ 8 domain

และกลุ่มที่มี 7-8 ZnF_C2H2 domain (รูปที่ 8) ซึ่งกลุ่มที่พบ 3 ZnF_C2H2 domain จะพบ ZnF_C2H2 เรียงตัวอยู่บริเวณปลายคาร์บอกซิล ในขณะที่ KLF ที่มี 7-8 ZnF_C2H2 domain พบมีทั้งที่เรียงตัวอยู่ทางปลายอะมิโนและปลายคาร์บอกซิล

BtKLF XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	YQCLLCQKVFQKSLYQSHLR-SHGKE-GEDPYRCNICGKTFFAVPARLTRHYRTHTGEKP
EmKLF XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	YQCLLCQKVFQKSLYQSHLR-SHGKE-GEDPYRCNICGKTFFAVPARLTRHYRTHTGEKP
BvnKLF XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	YQCLLCQKVFQKSLYQSHLR-SHGKE-GEDPYRCNICGKTFFAVPARLTRHYRTHTGEKP
DpKLF XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	EQCSTCRKMFSGKAALQTHQRQAHLKEEGADPYRCNICSKTFAVPARLTRHYRTHTGEKP
LvKLF XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	-----YECKICGKGFAPARLQRHHRVHTGEKP
HaKLF XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	-----YRCDVCNKVFAIPARLMRHQRIHTGEKP
	..*.*.* **:* ** *
BtKLF XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	YQCEYCSKSFVSVKENLSVHRRITHTKERPYKCDVCERAFEHSGKLHRHMRITHTGERPHKCT
EmKLF XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	YQCEYCSKSFVSVKENLSVHRRITHTKERPYKCDVCERAFEHSGKLHRHMRITHTGERPHKCT
BvnKLF XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	YRCEFCGKSFVSVKENLSVHRRITHTKERPYKCGVCERAFEHSGKLHRHMRITHTGERPHKCT
DpKLF XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	FRCEFCDKSFVSVKENLSVHRRITHTKERPYKCEVCSRAFEHSGKLHRHMRITHTGERPHKCT
LvKLF XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	FKCEFCDKTFSVSVKENLNVHRRITHTKERPYKCNICDRAFEHSGKLHRHMRITHTGERPHKCE
HaKLF XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	FKCEYCHKTFVSVKENLNVHRRITHTKERPYSCTVCGSAFEHSGKLHRHMRITHTGERPHKCE
	::**.* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:*
BtKLF XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	VCSKTFIQSGQLVIHMRTHTGEKPYVCKSCGKGFTCSKQLKVHTRTHTGEKPYTCDICGK
EmKLF XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	VCSKTFIQSGQLVIHMRTHTGEKPYVCKACGKGFTCSKQLKVHTRTHTGEKPYTCDICGK
BvnKLF XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	VCSKTFIQSGQLVIHMRTHTGEKPYVCKSCGKGFTCSKQLKVHTRTHTGEKPYTCDICGK
DpKLF XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	VCSKTFIQSGQLVIHMRTHTGEKPYVCTVCQKGFTCSKQLKVHSTRTHTGEKPYSCIEICGK
LvKLF XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	VCGKTFVQSGQLVIHMRTHTGEKPYTCEYCQKGFTCSKQLKVHTRTHTGEKPYECDVCGK
HaKLF XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	VCGKTFVQSGQLVIHLRAHTGEKPYSCDYCSKAFTCSKQLKVHLRTHTGEKPYGCDICGK
	**.*.*:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:*
BtKLF XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	SFGYNHVLKLHQVAHYGEKVYKCTLCHETFGSKKTMELHIKTH
EmKLF XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	SFGYNHVLKLHQVAHYGEKVYKCTLCHETFGSKKTMELHIKTH
BvnKLF XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	AFGYNHVLKLHQVAHYGEKVYKCTLCHETFGSKKTMELHIKTH
DpKLF XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	SFGYNHVLKLHQVAHYGEKVYKCTICNDTFNSKKSMEAHIKSH
LvKLF XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	TFGYNHVLKMHKMSHLGEKLYKCTLCEEFFSSRKSLDRHIRDH
HaKLF XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	TFGYNHVLKMHKMSHLGEKLYKCTLCDQIFSSRKTLDTTHIKDH
	::**:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:*

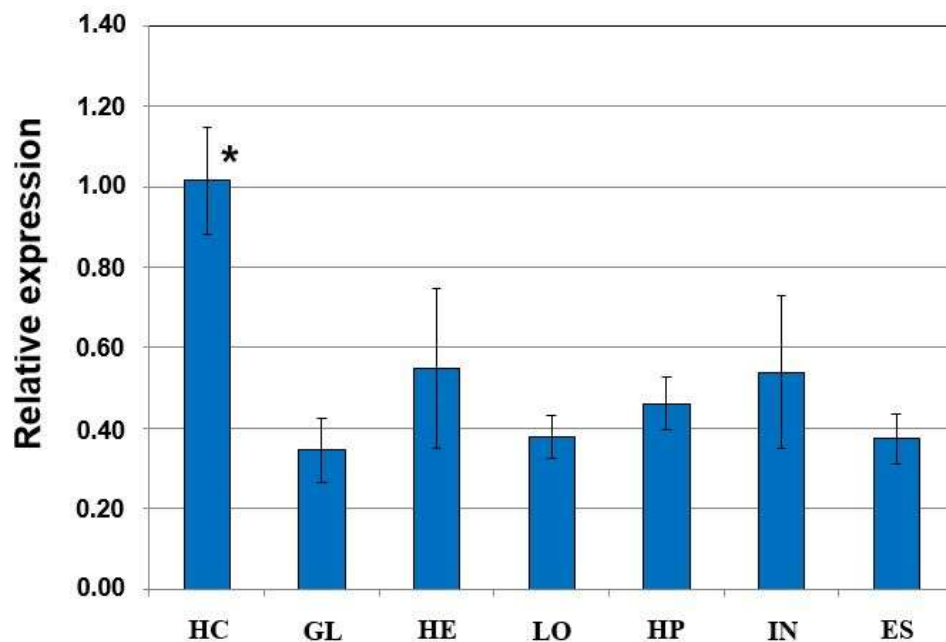
รูปที่ 7 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ KLF บริเวณ ZnF_C2H2 ในกลุ่มที่ประกอบด้วย ZnF_C2H2 3 domain ที่มีรายงานในกลุ่ม crustacean ได้แก่ *Hyalella azteca* (HaKLF, KAA0202655), LvKLF จากงานวิจัยนี้ (สีเขียว) และจากกลุ่ม arthropod ได้แก่ *Eufriesea Mexicana* (EmKLF, XP_017758246), *Bombus terrestris* (BtKLF, NP_001267850), *Bombus vancouverensis nearcticus* (BvnKLF, XP_033195450) และ *Dendroctonus ponderosae* (DpKLF, XP_019756355) โดยบริเวณที่ขีดเส้นใต้คือ ZnF_C2H2 * แสดงถึงกรดอะมิโนที่เหมือนกัน (.) และ (:) แสดงถึงกรดอะมิโนที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน

PvKLF11	-----FKCTFEGCDKTYKSSHLKSHNRSH---
PmKLF	-----FKCTFEGCDKTYKSSHLKSHNRSH---
MrKLF	-----FECPFEDCDKTYKSSHLKSHMRSH---
PhKLF11	-----YICTFPGCRKTYFKSSHLKAHLRTH---
HsKLF11a	-----YVCSFPGCRKTYFKSSHLKAHLRTH---
LvKLF13	-----HPCTFPGCDKIYGKSSHLKAHLRTH---
DrKLF15	-----HKCTFPGCAKMYTKSSHLKAHLRRH---
HsKLF15	-----HKCTFPGCSKMYTKSSHLKAHLRRH---
LvKLF15	-----FQCTHSGCGKVYAKSSHLKAHLRRH---
PhKLF1	-----HSCEYPGCTKTYTKSSHLKAHLRTHTEN
HsKLF1	-----HTCAHPGCGKSYTKSSHLKAHLRTH---
PcKLF	-----YQCKI--CGKGFAIPARLARHHRVH---
LvKLF	-----YECKI--CGKGFAIPARLQRHHRVH---
HaKLF	-----YRCDV--CNKVFAIPARLMRHQRIH---
BtKLF	YQCLLCQKVFDQKSLYQSHLR--SHGKE--GEDPYRCNI--CGKTFAVPARLTRHYRTH---
EmKLF	YQCLLCQKVFDQKSLYQSHLR--SHGKE--GEDPYRCNI--CGKTFAVPARLTRHYRTH---
BvnKLF	YQCLLCQKVFDQKSLYQSHLR--SHGKE--GEDPYRCNI--CGKTFAVPARLTRHYRTH---
DpKLF	EQCSTCRKMFSGKAALQTHQRQAHLKEEGADPYRCNI--CSKTFAVPARLTRHYRTH---
	* * * * * * * * * *
PvKLF11	-----TGEKPYHCSWESCGRRFARSDELNRHRTHTGEKKFVCSVCSTKFMRSDDLAKH
PmKLF	-----TGEKPYHCSWESCGRRFARSDELNRHRTHTGEKKFVCSVCSTKFMRSDDLAKH
MrKLF	-----TGEKPYKCSWEGCERRFARSDELNRHRTHTGEKKFGCPSCSAKFMCFDHLSKH
PhKLF11	-----TGEKPFSCSWDGDKRFARSDELNRHRTHTGEKKFVCPVCDRRFMRSDDLTKH
HsKLF11a	-----TGEKPFNCSDWGDCKKFARSDELNRHRTHTGEKKFVCPVCDRRFMRSDDLTKH
LvKLF13	-----TGERPPECTWASCRKRFARSDELARHTRTHTGEKNFVCPVCQKRFMRSDHLAKH
DrKLF15	-----TGEKLPFACTWPGCDWRFSRDELNRHRRSHSGVKPYQCPCVCEKKFARSDDLAKH
HsKLF15	-----TGEKLPFACTWPGCGWRFSRDELNRHRRSHSGVKPYQCPCVCEKKFARSDDLAKH
LvKLF15	-----TGEKPFVCTWPGCSWRFSRDELNRHRRSHSGVKPYRCHVCDKRFMRSDHLAKH
PhKLF1	FCLNHFTGEKPYRCFWEGCNWKFARSDELTRHYRKHTGQKPYECMLCKRAFMRSDHLALH
HsKLF1	-----TGEKPYACTWEGCGWRFSRDELNRHRRSHSGVKPYQCPCVCEKKFARSDDLAKH
PcKLF	-----TGEKPPKCEF--CEKTFSVKENLNVHRRHTHTKERPYKCNICDRSFEHSGKLHRH
LvKLF	-----TGEKPPKCEF--CDKTFSVKENLNVHRRHTHTKERPYKCNICDRAFEHSGKLHRH
HaKLF	-----TGEKPPKCEY--CHKTFSVKENLNVHRRHTHTKERPYSCVTCGSAFEHSGKLHRH
BtKLF	-----TGEKPYQCEY--CSKFSVKENLSVHRRHTHTKERPYKCDVCERAFEHSGKLHRH
EmKLF	-----TGEKPYQCEY--CSKFSVKENLSVHRRHTHTKERPYKCDVCERAFEHSGKLHRH
BvnKLF	-----TGEKPYRCEF--CGKFSVKENLSVHRRHTHTKERPYKCGVCERAFEHSGKLHRH
DpKLF	-----TGEKPPRCEF--CDKFSVKENLSVHRRHTHTKERPYKCEVCSRAFEHSGKLHRH
	***: : * : * * : : * * * : : * * * * : : * * *
PvKLF11	MKRH-----
PmKLF	MKRH-----
MrKLF	MKRH-----
PhKLF11	ARRH-----
HsKLF11a	ARRH-----
LvKLF13	ARRH-----
DrKLF15	IKVH-----
HsKLF15	IKVH-----
LvKLF15	HKVH-----
PhKLF1	MKRH-----
HsKLF1	MKRH-----
PcKLF	MRTHTGERPHKCEVCGKTFVQSGQLVIHMRHTGEKPYTCEYQKGFCTCSKQLKVHIRTH
LvKLF	MRTHTGERPHKCEVCGKTFVQSGQLVIHMRHTGEKPYTCEYQKGFCTCSKQLKVHIRTH
HaKLF	MRTHTGERPHKCEVCGKTFVQSGQLVIHMRHTGEKPYSCDYCSKAFCTCSKQLKVHIRTH
BtKLF	MRIHTGERPHKCTVCSKTFIQSGQLVIHMRHTHTGEKPYVCKSCGKGFCTCSKQLKVHIRTH
EmKLF	MRIHTGERPHKCTVCSKTFIQSGQLVIHMRHTHTGEKPYVCKACGKGFCTCSKQLKVHIRTH
BvnKLF	MRIHTGERPHKCTVCSKTFIQSGQLVIHMRHTHTGEKPYVCKSCGKGFCTCSKQLKVHIRTH
DpKLF	MRIHTGERPHKCTVCSKTFIQSGQLVIHMRHTHTGEKPYVCTVCQKGFCTCSKQLKVHIRTH
	: *
PvKLF11	-----
PmKLF	-----
MrKLF	-----
PhKLF11	-----
HsKLF11a	-----
LvKLF13	-----
DrKLF15	-----
HsKLF15	-----
LvKLF15	-----
PhKLF1	-----
HsKLF1	-----
PcKLF	TGEKPYECDVCGKTFGYNHVLKMHKMSHLGEKLYKCTLCEEFFNSRKALDRHIRDH
LvKLF	TGEKPYECDVCGKTFGYNHVLKMHKMSHLGEKLYKCTLCEEFFNSRKSLDRHIRDH
HaKLF	TGEKPYGCDICGKTFGYNHVLKMHKMSHLGEKLYKCTLCDQIFSSRKTLDTHIKDH
BtKLF	TGEKPYTCDICGKSGFYNHVLKLHQVAHYGEKVYKCTLCHEFTFGSKKTMELHIKTH
EmKLF	TGEKPYTCDICGKSGFYNHVLKLHQVAHYGEKVYKCTLCHEFTFGSKKTMELHIKTH
BvnKLF	TGEKPYTCDICGKAFGYNHVLKLHQVAHYGEKVYKCTLCHEFTFGSKKTMELHIKTH
DpKLF	TGEKPYSCBICGKSGFYNHVLKLHQVAHYGEKVYKCTICNDTFNSKKSMEAHIKSH

รูปที่ 8 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน บริเวณ ZnF_C2H2 ของ KLF ที่ประกอบด้วย ZnF_C2H2 3, 7 และ 8 domain

4.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน *LvKLF* ในเนื้อเยื่อกุ้งขาวสุขภาพดี โดยใช้เทคนิค qRT-PCR

ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *LvKLF* จากเนื้อเยื่อทั้ง 7 อวัยวะของกุ้ง ได้แก่ เม็ดเลือด (HC), เหงือก (GL), หัวใจ (HE), อวัยวะน้ำเหลือง (LO), ตับ (HP), ลำไส้ (IN) และก้ามตา (ES) ด้วยเทคนิค qRT-PCR พบ *LvKLF* มีการแสดงออกในหลายอวัยวะ โดย *LvKLF* มีการแสดงออกมากที่สุดในเม็ดเลือดอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในรูปที่ 9

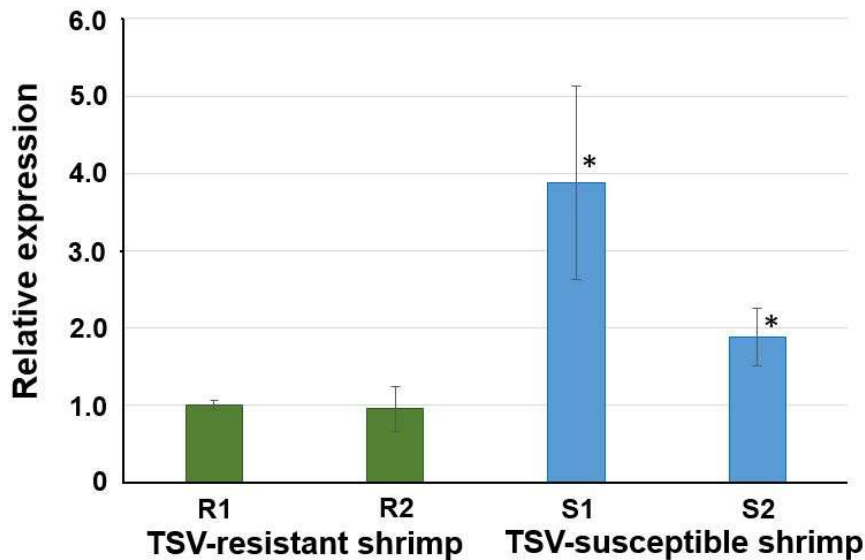


รูปที่ 9 การแสดงออกของยีน *LvKLF* ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* สุขภาพดีจำนวน 5 ตัว ด้วยเทคนิค qRT-PCR โดยใช้ยีน EF-1 α เป็นยีนควบคุม

4.3 การศึกษาการแสดงออกของยีน *LvKLF* ในเม็ดเลือดกุ้งสายพันธุ์ต้านทานและไม่ต้านทานไวรัสทอรา โดยใช้เทคนิค qRT-PCR

เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *LvKLF* ในกุ้งสภาวะปกติทั้งสายพันธุ์ต้านทานและไม่ต้านทานไวรัสทอราจึงเก็บเลือดจากกุ้งทั้งสองสายพันธุ์ สายพันธุ์ละ 2 ครอบครัว ครอบครัวละ 25 ตัว จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *LvKLF* โดยเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนนี้ในครอบครัวอื่นๆ กับการแสดงออกของยีน *LvKLF* ในกุ้งสายพันธุ์ต้านทานไวรัสทอราครอบครัวที่ 1 ด้วยเทคนิค qRT-PCR จาก

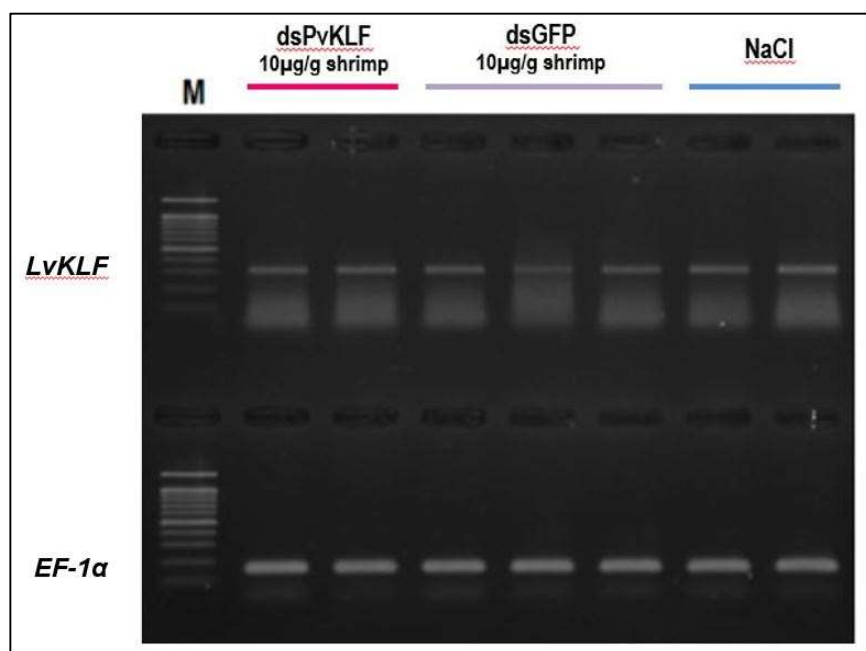
การศึกษาพบว่า กุ้งสายพันธุ์ต้านทานไวรัสทอราทั้งสองครอบครัวมีการแสดงออกของยีน *LvKLF* มีการแสดงออกของยีนต่ำอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับการแสดงออกของยีนในสองครอบครัวของกุ้งสายพันธุ์ไม่ต้านทานไวรัสทอรา ดังแสดงในรูปที่ 10



รูปที่ 10 การแสดงออกของยีน *LvKLF* ในกุ้งสายพันธุ์ต้านทาน (R1 และ R2) และไม่ต้านทานไวรัสทอรา (S1 และ S2) ครอบครัวละ 25 ตัว โดยเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *LvKLF* เทียบกับการแสดงออกของยีน *EF-1 α* ที่เป็นยีนควบคุม ก่อนเปรียบเทียบการแสดงออกของแต่ละครอบครัวกับกุ้งสายพันธุ์ต้านทานไวรัสทอราครอบครัวที่ 1

4.4 การศึกษาหน้าที่ของ *LvKLF* ด้วยเทคนิค RNAi

เพื่อศึกษาหน้าที่ของ *LvKLF* จึงทำการยับยั้งการแสดงออกของยีน *LvKLF* โดยการใช้ ds*LvKLF* จากการทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ ds*LvKLF* ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน โดยฉีด ds*LvKLF* 5 และ 10 μ g ต่อกุ้ง 1 g โดยได้ทำการสร้าง ds*LvKLF* จากสองบริเวณที่แตกต่างกัน พบว่า ไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *LvKLF* ได้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 11) ซึ่งให้เห็ว่ายีนนี้น่าจะเป็นยีนที่มีความสำคัญจำเป็นต่อใช้ในการดำรงชีพ



รูปที่ 11 การแสดงออกของยีน LvKLF เทียบกับการแสดงออกของยีน EF-1 α ในกุ้งที่ได้รับ dsLvKLF และ dsGFP ปริมาณ 10 µg / 1 g กุ้ง และ NaCl โดยใช้กุ้งขนาด 3 กรัม

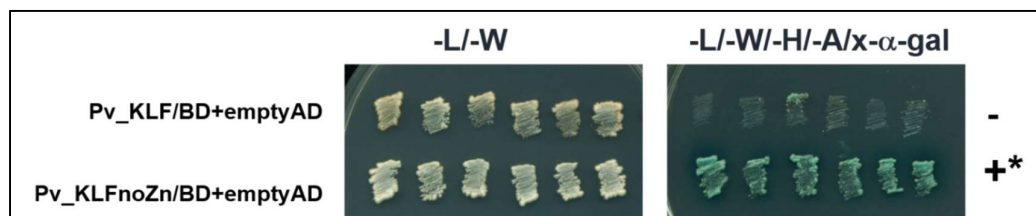
4.5 การศึกษาปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน LvKLF กับโปรตีนของ ไวรัสทอรา และโปรตีนอื่นของของกุ้ง

4.5.1 การสร้าง bait plasmid (*LvKLFpGBKT7*) และการทดสอบ auto-activation และ toxicity ของ bait plasmid

เพื่อศึกษาปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน LvKLF กับโปรตีนอื่นในกุ้งและของไวรัสทอรา ด้วยเทคนิค Yeast Two-Hybrid จึงโคลนยีน *LvKLF* เข้าสู่ pGBKT7 vector โดยยีน *LvKLF* และยีน *LvKLF* ที่ไม่มี ZnF_C2H2 domain (*LvKLFnoZn*) มีขนาด 1,833 เบส และ 1,008 เบส (รูปที่ 12) ตามลำดับ เพื่อเป็น bait protein vector หลังจากตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วจึงย้าย *LvKLFpGBKT7* และ *LvKLFnoZnpGBKT7* เข้าสู่ยีสต์ AH109 เพื่อทดสอบ auto-activation และ toxicity พบว่า เมื่อเลี้ยงยีสต์ที่มี vector ที่มียีน *LvKLF* และ *LvKLFnoZn* บนอาหารเลี้ยงยีสต์ ที่มี x- α -gal แต่ไม่มีกรดอะมิโน leucine, tryptophan, histidine และ alanine เป็นเวลา 1 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 30°C พบโคลนที่มียีน KLF และ KLFnoZn ไม่มีความเป็นพิษกับยีสต์ แต่โคลนที่มียีน *LvKLFnoZn* เกิด auto-activation ซึ่งพบโคโลนีของยีสต์มีสีฟ้าดังรูปที่ 13 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงใช้เฉพาะ bait protein vector ที่มียีน *LvKLF* เพียงชนิดเดียว



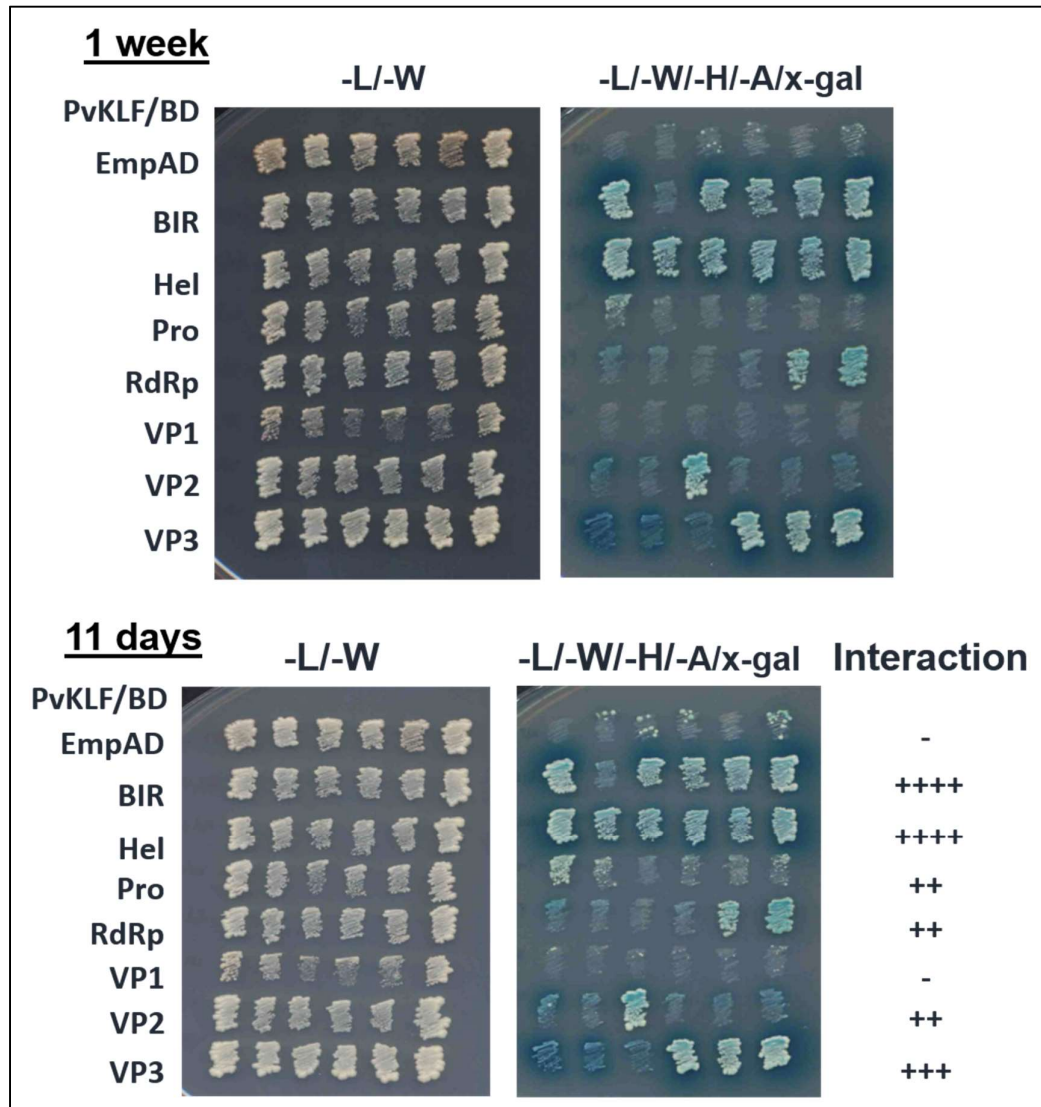
รูปที่ 12 การทำ PCR เพื่อตรวจสอบโคลนที่มียีน *LvKLF* และ *LvKL noZn* ใน pGBKT7 vector M แสดง DNA marker เพื่อส่งตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์



รูปที่ 13 การทดสอบ auto-activation และ toxicity โดยการเลี้ยงยีสต์ที่มี bait protein vector ที่มียีน *LvKLF* และ *LvKLFnoZn* ตามลำดับ บนอาหารเลี้ยงยีสต์ที่มี x- α -gal แต่ไม่มีกรดอะมิโน leucine (L), tryptophan(W), histidine (H) และ alanine (A) เป็นเวลา 1 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 30 °C โดยมียีสต์ empty AD เป็นตัวควบคุม

4.5.2 การศึกษาปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน *LvKLF* กับโปรตีนของไวรัสทอรา

เพื่อศึกษาปฏิสัมพันธ์ของ โปรตีน *LvKLF* กับ โปรตีนของไวรัสทอรา จึงอาศัยเทคนิค yeast two hybrid ทำการ co-transform *KLF/BD* กับ *TSV/AD* แล้วเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงยีสต์ ที่มี x- α -gal แต่ไม่มีกรดอะมิโน leucine (L), tryptophan(W), histidine (H) และ alanine (A) เป็นเวลา 1 สัปดาห์และ 11 วัน ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 30 °C ซึ่งพบว่า โปรตีน *LvKLF* มีปฏิสัมพันธ์กับ non-structural protein ได้แก่ โปรตีน BIR, Helicase และ RNA-dependent RNA polymerase และมีปฏิสัมพันธ์กับ structural protein ได้แก่ VP2 และ VP3 โดยที่ RNA-dependent RNA polymerase และ VP2 แม้จะมียีสต์ขึ้นน้อย แต่โคลนของยีสต์มีของการสร้างเอนไซม์ galactosidase ดังรูปที่ 14

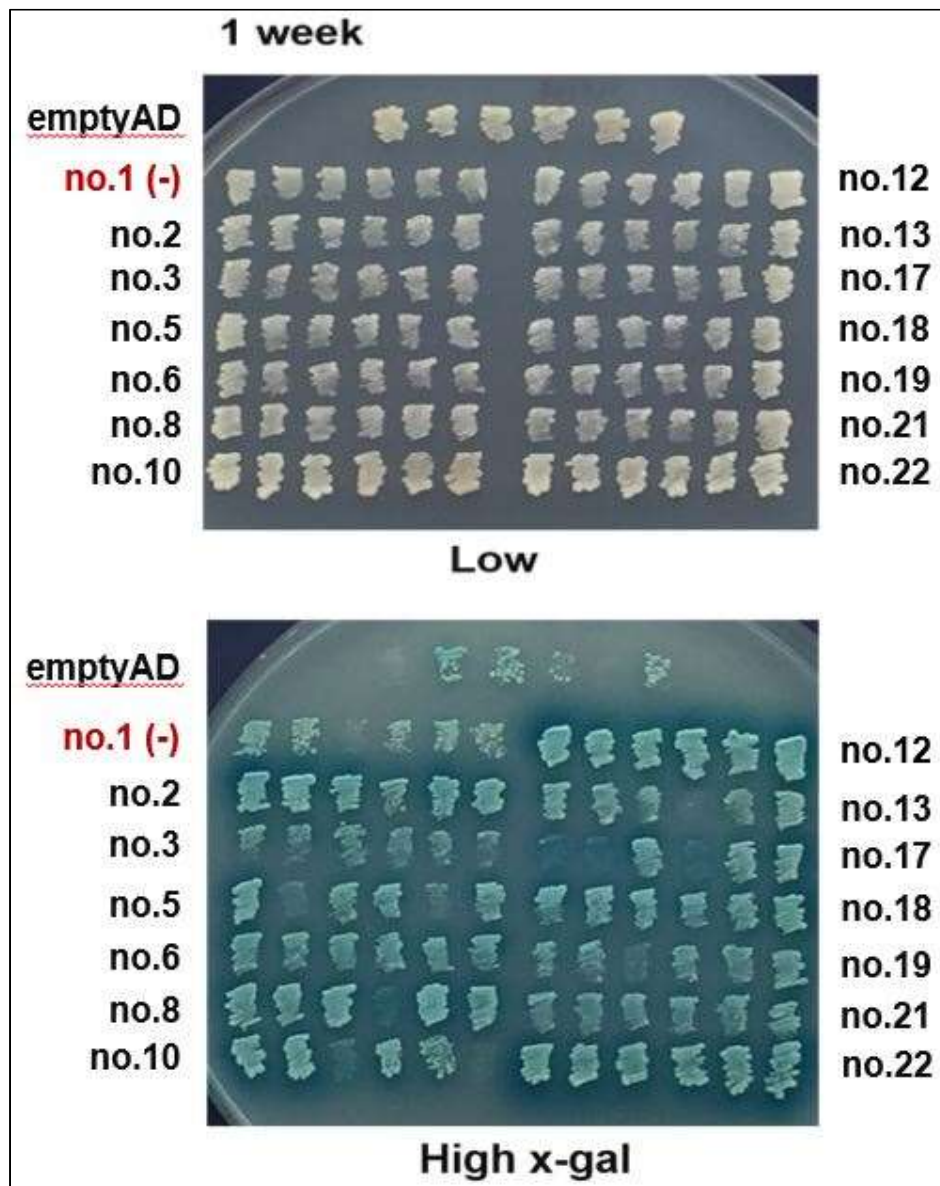


รูปที่ 14 Co-transform LvKLF/BD กับ TSV/AD (BIR-like sequence (BIR), helicase (Hel), protease (Pro), RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), VP1, VP2 และ VP3) บนอาหารเลี้ยงยีสต์ที่มี x- α -gal แต่ไม่มีการดออะมิโน leucine (L), tryptophan(W), histidine (H) และ alanine (A) เป็นเวลา 1 สัปดาห์และ 11 วัน ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 30 °C โดยมียีสต์ empty AD (EmpAD) เป็นตัวควบคุม

4.5.3 การศึกษาปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน LvKLF กับโปรตีนอื่นของกั๋ง

เพื่อศึกษาปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน LvKLF กับโปรตีนตัวอื่นในกั๋งจึงทำการ co-transform KLF/BD กับ Lv library/AD แล้วเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงยีสต์ High- x- α -gal ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 1 อาทิตย์ จากผลการทดลองพบโคโลนีของยีสต์เป็นสีฟ้า 13 โคลนจาก 15 โคลนดังรูปที่ 15 เมื่อตรวจสอบ

ลำดับนิวคลีโอไทด์โดย BlastX เปรียบเทียบกับยีนที่มีรายงานใน GenBank พบเหมือนกับยีนที่มีรายงานแล้วของ *L. vannamei* เช่น voltage-dependent anion-selective channel, Elongation factor 1-alpha, Non-specific lipid-transfer protein, PHD finger protein และ Cathepsin L เป็นต้น ตารางที่ 3



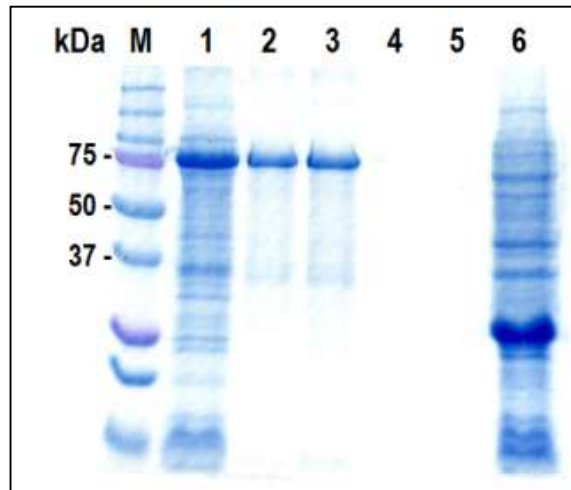
รูปที่ 15 Co-transform *LvKLF/BD* กับ *Lv library/AD* บนอาหารเลี้ยงยีสต์ที่มี x- α -gal แต่ไม่มีการดอะมิโน leucine (L), tryptophan(W), histidine (H) และ alanine (A) เป็นเวลา 1 สัปดาห์

ตารางที่ 3 แสดงโปรตีนของกุ้งที่มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน LvKLF

Prey No.	% identity	Gene / Organism
2	87	voltage-dependent anion-selective channel / <i>L. vannamei</i>
3	80	Unknown / <i>L. vannamei</i>
5	99	Uncharacterized protein / <i>L. vannamei</i>
6	99	Elongation factor 1-alpha / <i>L. vannamei</i>
8	96.3	Collagen alpha-1 / <i>Daphnia magna</i>
10	96	18s ribosomal RNA / <i>L. vannamei</i>
12	80	Y+L amino acid transporter 2 / <i>Drosophila ficusphila</i>
13	61	Retinoid-inducible serine carboxypeptidase / <i>Hyalomma azteca</i>
17	80	Hemocyte cDNA library / <i>L. vannamei</i>
18	99	Cathepsin L / <i>L. vannamei</i>
19	80	Non-specific lipid-transfer protein / <i>L. vannamei</i>
21	80	Unknown / <i>L. vannamei</i>
22	42	PHD finger protein / <i>L. vannamei</i>

4.6 การผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ LvKLF และทำบริสุทธิ์

เพื่อยืนยันผลการเกิดปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน LvKLF และโปรตีนของไวรัสและโปรตีนของ กุ้ง จึงทำการผลิตโปรตีน rLvKLF โดยโคลนยีน KLF เข้าสู่ pET17b และ transform เข้าสู่ *E. coli* BL21 codon plus หลังจากชักนำให้แสดงออกโปรตีนและตรวจสอบด้วย SDS-PAGE พบโปรตีนขนาด 75 kDa ดังรูปที่ 16 สอดคล้องกับการคำนวณด้วยโปรแกรมซึ่งพบว่าโปรตีนมีขนาด 72.16 kDa และมีค่า pI จากการคำนวณเท่ากับ 8.54 โดยพบอยู่ในรูปของ inclusion body อย่างไรก็ดีเมื่อทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วย Ni-column พบว่า rKLF ไม่สามารถจับกับ column ได้ซึ่งจะทำการแก้ไขโดยการย้าย His tag จากปลายทางด้านคาร์บอกซิลให้ไปอยู่ทางด้านปลายอะมิโน



รูปที่ 16 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน KLF ในระบบ *E. coli* BL21 codon plus

Lane 1 คือ crude protein หลังจากชักนำให้ผลิต rKLF ที่ 6 ชั่วโมง

Lane 2 คือ โปรตีนส่วน Flow through

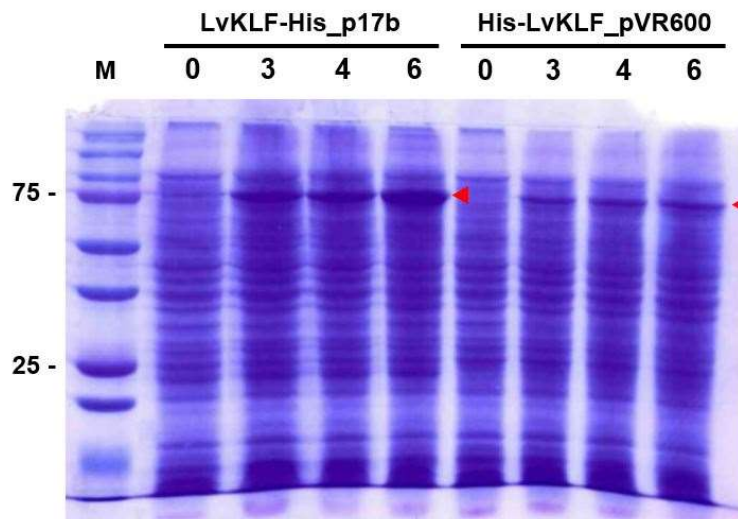
Lane 3 คือ โปรตีนส่วน Flow through

Lane 4 คือ โปรตีนหลังจาก elute ด้วย 100 mM Imidazole in denatural solution

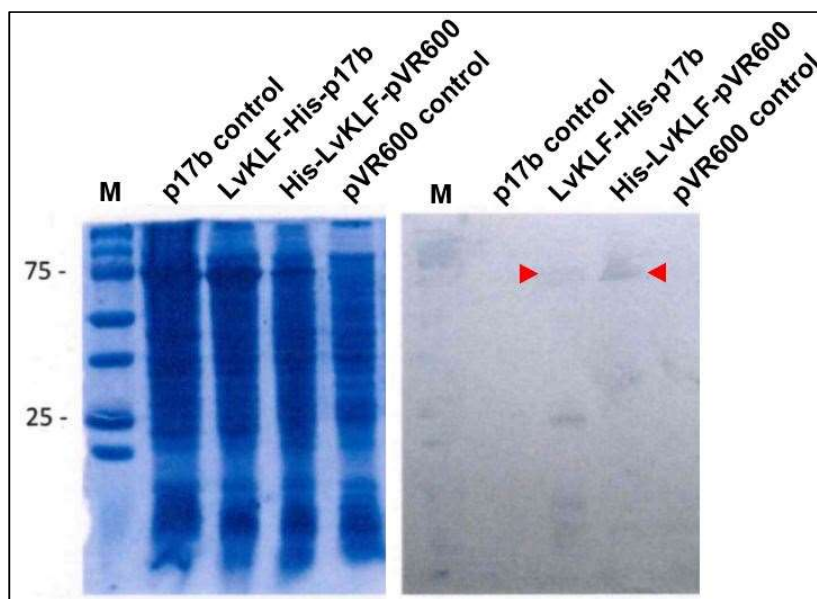
Lane 5 คือ โปรตีนหลังจาก elute ด้วย 300 mM Imidazole in denatural solution

Lane 6 คือ โปรตีน ของ pET17b ที่ไม่มี ยีน KLF หลังชักนำให้ผลิตโปรตีนที่ 6 ชั่วโมง

เมื่อโคลนยีน *LvKLF* เข้าสู่เวกเตอร์ pVR600 ซึ่งเป็นเวกเตอร์ที่ทำการปรับปรุงมาจาก pET28b ซึ่งจะได้ His tag อยู่ปลายทางด้านอะมิโน หลังจากตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วจึง transform เข้าสู่ *E. coli* BL21 codon plus หลังจากชักนำให้แสดงออกโปรตีนและตรวจสอบด้วย SDS-PAGE พบโปรตีนขนาด 75 kDa ดังรูปที่ 17 สอดคล้องกับการคำนวณด้วยโปรแกรมซึ่งพบว่าโปรตีนมีขนาด 70.94 kDa และมีค่า pI จากการคำนวณเท่ากับ 8.37 โดยพบอยู่ในรูปของ inclusion body และพบว่า plasmid *LvKLF*-His_pET17b ผลิตโปรตีนได้มากกว่า plasmid His-*LvKLF*_pVR600 อย่างไรก็ตาม เมื่อยืนยันการสร้าง r*LvKLF* ด้วยการทำ western blot พบว่า r*LvKLF* ที่ได้จาก plasmid His-*LvKLF*_pVR600 ตรวจพบการแสดงออกของโปรตีน r*LvKLF* มากกว่าจาก plasmid *LvKLF*-His_pET17b (รูปที่ 18)



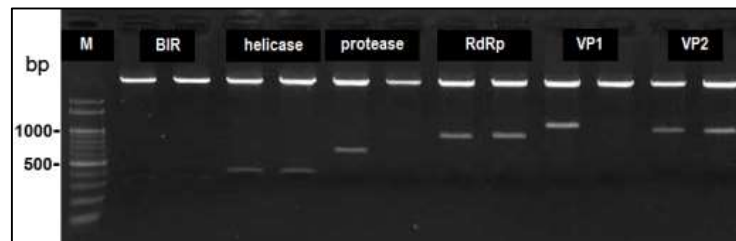
รูปที่ 17 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน rLvKLF ใน *E. coli* BL21 codon plus จาก plasmid LvKLF-His_p17b และ plasmid His-LvKLF_pVR600 ที่เวลา 0, 3, 4 และ 6 ชั่วโมงตามลำดับ ลูกศรแสดง rLvKLF



รูปที่ 18 ตรวจสอบการผลิต recombinant โปรตีน LvKLF จาก plasmid LvKLF-His_pET17b และ plasmid His-LvKLF_pVR600 (แสดงด้วยลูกศรแดง) ด้วย 15% SDS-PAGE และ ยืนยันผลของรีคอมบิแนนท์โปรตีน ด้วย western blot analysis โดยมี *E. coli* BL21 codon plus ที่มี pET17b และ pVR600 เป็นตัวควบคุม

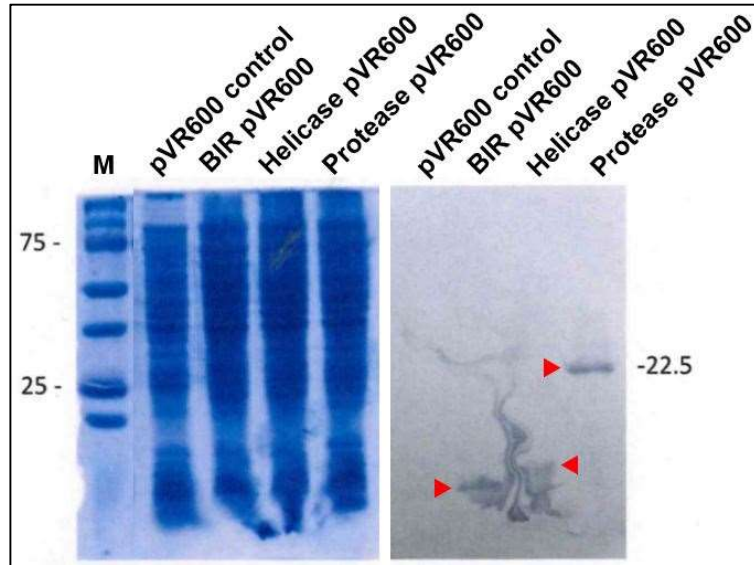
4.7 การผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ของไวรัสทอรา และทำบริสุทธิ์

ไวรัสทอราประกอบด้วย 2 open reading frame (ORF) โดยทั้งสอง ORF อยู่คนละ frame กัน ORF แรกประกอบด้วย non-structural protein 4 ยีนได้แก่ BIR-like sequence (BIR), helicase (H), protease (P) และ RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) ดังรูปที่ 1 ส่วน ORF ที่ 2 ประกอบด้วยส่วนของ structural protein 3 ยีน คือ VP1, VP2 และ VP3 (Mari et al., 2002) จึงทำการโคลนยีนทั้ง 7 ยีนเข้าสู่เวกเตอร์ pVR600 ซึ่งเป็นเวกเตอร์ที่ปรับปรุงจากเวกเตอร์ pET28b ซึ่งตัดส่วนของ T7 Tag ออก โดยขั้วขึ้นของไวรัสได้จากการทำ PCR จาก cDNA ของกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสทอรา หลังจากโคลนแล้วทำการตรวจสอบขั้วขึ้นที่ได้โดยการตัด recombinant pVR600 ด้วยเอ็นไซม์ แล้วตรวจสอบขั้วขึ้นจากการทำ electrophoresis (รูปที่ 19) หลังจากตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว จึง transform plasmid เข้าสู่ *E. coli* BL21 codon plus



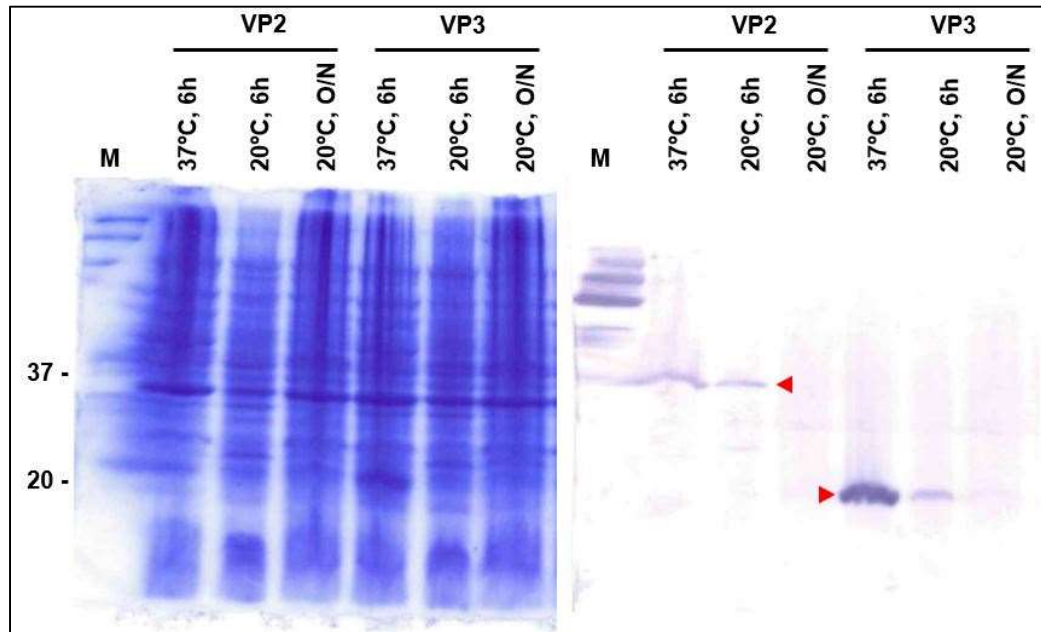
รูปที่ 19 ตรวจสอบ recombinant pVR600 ที่มีขั้วขึ้นของยีน BIR, helicase, protease, RdRp, VP1 และ VP2

เมื่อทำการผลิต recombinant โปรตีนด้วยการชักนำด้วย 1mM IPTG และตรวจสอบด้วย SDS-PAGE (รูปที่ 20) และเมื่อยืนยันผลการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วยเทคนิค western blot analysis พบว่า non-structural protein 3 โปรตีน ได้แก่ BIR, helicase และ protease มีขนาด 8.19 KDa, 12.80 KDa และ 22.49 KDa ตามลำดับ (รูปที่ 20)



รูปที่ 20 ตรวจสอบการผลิต recombinant โปรตีน BIR, helicase และ protease (แสดงด้วยลูกศรแดง) ด้วย 15% SDS-PAGE และ ยืนยันผลของรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วย western blot analysis โดยมี *E. coli* BL21 codon plus ที่มี pVR600 เป็นตัวควบคุม

ส่วน structural protein VP2 และ VP3 ซึ่งมีปฏิสัมพันธ์กับ LvKLF พบว่าเมื่อ ชักนำให้มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วย 1mM IPTG แล้วตรวจสอบการผลิตด้วย SDS-PAGE และยืนยันรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วยเทคนิค western blot analysis จะพบรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 และ VP3 มีขนาด 35 kDa และ 20 kDa ตามลำดับ (รูปที่ 21) ซึ่งสอดคล้องกับการคำนวณด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ รีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 มีขนาด 35.81 kDa และมีค่า pI 4.6 ในขณะที่ รีคอมบิแนนท์โปรตีน VP3 มีขนาด 20.83 kDa และมีค่า pI 4.78 ตามลำดับ ซึ่งรีคอมบิแนนท์โปรตีนผลิตออกมาในรูปของ inclusion body และพบว่า rVP2 และ rVP3 เมื่อชักนำให้มีการแสดงออกด้วย 1 mM IPTG หลังจากนั้นเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C จะสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้เยอะกว่าการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 20 °C นอกจากนี้ยังพบว่า การเลี้ยงเชื้อที่ 20 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีการผลิตโปรตีนมากกว่าการเลี้ยงเชื้อที่ 20 °C เป็นเวลาข้ามคืน



รูปที่ 21 ตรวจสอบการผลิต recombinant โปรตีน VP2 และ VP3 ที่เลี้ยงเชื้อหลังการ induction ที่อุณหภูมิ 37 °C และ 20 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และ ข้ามคืนตามลำดับ (แสดงด้วยลูกศรแดง) ด้วย 15% SDS-PAGE และ ยืนยันผลของรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วย western blot analysis โดยมี *E. coli* BL21 codon plus ที่มี pVR600 เป็นตัวควบคุม

4.8 การระบุความแตกต่างระดับจีโนมิกส์ DNA ของยีน KLF ระหว่างกิ่งสายพันธุ์

ด้านทานและไม่ด้านทานไวรัสทอรา

4.8.1 การจัดเรียงตัวของยีน *LvKLF*

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ระดับจีโนมิกส์ดีเอ็นเอบริเวณที่ควบคุมการแสดงออกของยีน *LvKLF* ด้วยการใช้เทคนิค genome walking รวมถึงการหาส่วนของ intron ที่แทรกอยู่ระหว่างยีน หรือ exon ด้วยการใช้เทคนิค PCR พบว่า *LvKLF* ประกอบด้วย 4 intron แทรกอยู่ระหว่าง 4 exon โดย 4 intron มีขนาด 623, 735, 279 และ 161 เบสตามลำดับ ในขณะที่ 4 exon มีขนาด 232, 427, 172 และ 1,569 เบสตามลำดับ (รูปที่ 22-23) โดยพบ tata box ที่ตำแหน่ง -31 จาก transcription start site และพบ ATG อยู่ที่ exon ที่ 2 ตามแบบจำลองการเรียงตัวของยีน *LvKLF* (รูปที่ 23)

gtaccatacatcccatagattacgttccatttgattgttacagtgattacaagtcgaatcagaaccactg
tgttttcgtttgttatggctacgcgacacaattacaataacgcttgtttatgactgttgaatagtcgcgtattaat
gagttcatcacgttttaataagattgctgaacataacttaaaaggaatagcaatagcagagagattataataca
ttttatagtttttatataaaaaataaaagaaattcatttctctcaaaacttgctgcacttgctgcagtcgtt
tgactcgtggcgagcgtgccacatctctaggtacatgtcgaaaaataactatagttgaagtcctcatatataacac
caaggcgagatcaagattattcaatacatcttaagattttatcccatctccagatcgcataaaaaataagtaa
ggaacataattaatacaatagtagtaaaatctgacacatcaggattgagtaatttcttggcgcccccactaaagctg
tacttacgcgcttgttgcagagtcgccgctgcgcagcacacagtgtagcagccgtccgccccgcgcgcgcg
agccacgagcgtgacccacctcactgactccgctgcgcagacacagcattaaaaattactttatataatctcaa
atccatgcaagttgtaattattcgaacttatctcattatattggaaggcccaattttccctagataaaaa

+1

tccgttcggaagcaacacccgtGgatgagaaacgaagccagtagcacagcttggcgcgctgctggctggat
ctcaaccttttggctctatgaggtttggggagcttctgcccAGATGGAAGCTACTGCGCTTGTGTGAACCCATAGCA
TATATGTGAACCCGATCTCGGGGAACACATAGTTCTGTTCCGATGTGGAAGCAGTGAGCTTACCAGCGTAGAAC
TTACTCTAGAGAACTCAGTTCTCAACATAGTGCAATTGTTACCCAGCAAACTAGTGCAATTGGATCTTACTTGT
GCTAATATCAAGTCTTATACATTCTGTGTACAAGGAAGACTGTTCTGtagtattgtgatactcttggtcatgtgt
tataaagtgcagaaatttcagcatcacattaccctgatactgaaataagaaccagttgtattgtgtgcagatgc
cccaactttcaagggaatgtttcgaatgcacactcagtggtgtgttaggaaaaactcatcttggtattgtgattg
ttatagtagtctttccataatagtaaaatcaatatttccaatatttccctgtgtgctgaattattatgtgctg
tgcaagaactctttcatgtgtgataatattactttaccgcacttattgaaatccaaatttttcttgattagtttcat
agtttctattttttatattgtgtaatttttgcgaagcagacaatcgtacaagtttaccctcacattctattttaa
tagagatcgatccactgcagagagctacattcaactggtggagaccctgtgcttgtttcttatttccatcat
ttactgttccactctacatagttaattcacaggatttcccttgcgatgaatcgaaggcccaaggacagta
cgatagtgaattattgtgtaattaaatcaatcaacttggctcctcatgatcaatggaccagcatattatatt
tgtgtcacgacaggacaggaatagatcacgaataccctctgcagtcgaagcagactcgcttaaaatccaagtagt
gtaaactaagcccaacgtttttccccacAGAGAGAGCGGCCATGATGCCCGAGGGAATGGCGGTGCGGCCA

M A M M P Q G M A V A P

TACACAGCGGGGCCACCTCCTGCGCCCATGGATGTAGAACACGGCTACCAACACATGCCGCCATGCACCCCGAG
Y T A G P P P A P M D V E H G Y Q H M P P M H P Q
CCCCACCCACAGTCTACCCACAGCCCATCACCAGCCGACACACAGCCGAGTACCCACAGTCAAGCT
P H P Q S H P Q P H H Q P Q T Q P Q Y P P V M Q A
CAGGCCCGCTCCTGTGGAAGAGGAGCAGAACATTGATCAGCTAATGGTGGGTCGGAGCCGCGTACGAGTGT
Q A P A P V E E E Q N I D Q L M V G S E P P Y E C
AAAATCTGCGGGAAGGGTTTCGTATCCAGCGCGCTCCAGCGGCACCACGAGTTCACACGGGAGAAAAACCC
K I C G K G F A I P A R L Q R H H R V H T G E K P
TTTAAGTGtagtatcgccctcggttgcctcttgcagtagtagtgaaccaatattaacttaagttaagttacg
F K C

tattagtagtagtgcacatcaatagaatgcgactgactcatggataatacagtaaataggactcgcttaagcacatg
cagtttggctcaaatattattctttagcaaaagcaactgattaaacaagtagtttagaggaaagattttagaata
tgtagcttgcgtaaacatcctttgtgctggaactaaataaatttttcttactcaacAGCGAATCTGCGAC

E F C D

AAGACGTTTAGTGTCAGGAAGAAACCTGAACGTGCACCGCCGTATCCACACCAAGGAGCGCCTTACAAGTGTAAT
K T F S V K E N L N V H R R I H T K E R P Y K C N
ATCTGTGATCGCGCTTCGAGCACTCTGCAAACTCCACCGCCATATGAGGACCCATACAGGGGAAAGGCCCAT
I C D R A F E H S G K L H R H M R T H T G E R P H
AAGTGTGAGtagtggaatgcgaggaattctcttaacatttccgtgtccagtaatgcataaaatgttggttatagt
K C E

aagctgtgttggcagttgtcggaaagcttgtttgtttgatttcttgaatagtggtgtatcatatatttaagt
attgtttttcttcttctcAGGTTTGCGGAAGACATTCTGTGAGTCTGGTCACTGCTGATCCACATGAGAGCCC

V C G K T F V Q S G Q L V I H M R A H

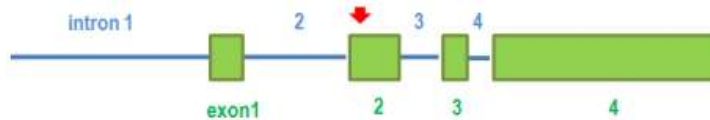
ACACTGGAGAGAAGCCATACACCTGTGAATACTGCCAGAAAGTTTACCTGCTCCAGCAATTGAAGGTTTCACA
T G E K P Y T C E Y C Q K G F T C S K Q L K V H I
TCCGTACCCACACAGGAGAAAAACCTATGAATGCGACGTGTGCGGAAAAACCTTTGGCTACAACCCAGTACTCA
R T H T G E K P Y E C D V C G K T F G Y N H V L K
AGATGCACAAGATGTCTCATCTCGGTGAAAGCTTTACAATGTACTCTGTGTGAGGAATTTCTTCTCTCACGCA
M H K M S H L G E K L Y K C T L C E E F F S S R K
AGTCTCTGGACCGCCACATCCGTGACCACAGCCAAGAGCCCTGCTCAAGCCGAAAGCAGCAGCCGCCAAGCAGG
S L D R H I R D H S Q E P C S S R K Q Q P A K Q Q A
CCGAGCCTCGGACGAATGGCAACATCATCTCCTGCAATGACTGCCACAGATTCCAGCTCCCATTCCTCCCCCA
E P R Q Q W Q T S S P A M T A T D S S S H S S P T
CCAACCTCTCCCCACCAACTCTTCTCTCCAGCTTCACTATCTTGGGATAGTGAGTCTGCGGAGCAACAGTTGC
N S S P T N S S S P A S V S W D S E S A E Q Q L P
CGTTTCGTGAGTTTCGAAGACCATCGGAAGGGCCAGTCGCCAGCGGACCTGAAGTGTACACTTGTCCAGGATACG
F R E F R R P S E G P V A S G P E V Y T C P G Y D
ACAACATCGGCTCTCGATCTCCTGGGTACGTACGCGATGACAGCGGTGAGGAGCTAGCCCCGTGAGCGACACTC

N I G S R S P G Y V S D D S G R G A S P V S D T L
TCTCCCCACCTAGATCTCAATCACTTCTGGACCTCCTCTAAATACCCAGCTGCCACAACCTCTCATATCATTTG
S P P R S P I T S G P P L N T Q L P Q P P H I I D
ATGCCCGCCCATGGCGCCACGAACCTCCGAGGACTACAACATGTTCTCTGCGGCGTCTTACCTCTCCCTGTAG

A P P M A P R T P E D Y N M F L R R L Y P S L V V
TACCTAAGCCCGAGCCCTCGCGCTTCGACAACGAGCAATGGCAGTCTTACCACAGAAACGGGAGAGAGAGTTT
P K P E P S R F D N Q R M A V F T T E T G E R V S
CATGCCCTTATGATCTCTGCTTCACTGCAAGGAAACAAAGCATGTATCTGGAACAAAGAAATGGCTGAACAGG
C P Y D L L L A L Q G N K S M Y L E Q R M A E Q E
AAGCTCTCGTGGCAGCAGCAGCAGTGAAGAACATTACATGCGGGAGGAGACTCGCCGAGGCGCGAAGCTG
A L R R Q Q Q Q L E E H Y M R E E T R R R R E A A
CTTTCTTTGAAACCGTCGAGCGCTCTGAAGGCACTTGTGGGCAAGGAAAGGCTCGAGCGGCTAGGGCACCCCT
F F E T V E R V L K A L V G K E R L E R L G H P H
ACATACCCGTCGATGAAGTCTCATGAAACCATTAACCTCATGGGATCCCAACCATGCAAGGAGCCCTCCCTGT
I P V D E V L M K T I T L M G S Q P C K E P S L Y
ACGCCATGGACCGCATCAAGTGAACCTGCGGCTCTGCGGAGTGACAGCTGCCGACAGACCATGTGGGTGCA
A M D R I K V N L R L L P E C S V P D Q T M W V K
AATTGCGGTGGCGAGGAAAGCCATCAGGAGATCGTGGCCGAGTCTCTTCACTACTGCTAGcaagggtgtogaa
F G W R G K P I E E I V A E F L H Y C *

ggagcgcgcgcctacogctcogcttgaactcttagcagctgttctgtgtcacttccattctctctctcag
tatttttatgttaacttatagtgtaagctatacctctagtgctcagtgagtagtgctcacttttttatgttga
agcattccattgtatagtgctttatatttaatgcacaatgaatgcttaaatattatgttggaatgttaa
agatgaatatacatatattttgaatgtactgtttaataaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

รูปที่ 22 การจัดเรียงตัวของ LvKLF ซึ่งประกอบด้วย 4 intron แทรกระหว่าง 4 exon พบ TATA box ที่ตำแหน่ง -31 จาก transcription start site และพบ ATG อยู่ที่ exon ที่ 2 แถบเขียวแสดงตำแหน่ง transcription start site แถบน้ำเงินแสดง splice site แถบสีแดงและสีม่วงแสดง start codon และ stop codon ตามลำดับ



รูปที่ 23 แบบจำลองการจัดเรียงตัวของ LvKLF ซึ่งประกอบด้วย 4 exon และ 4 intron โดยพบ start codon (ATG) อยู่ที่ exon 2 แสดงด้วยลูกศรสีแดง

เมื่อนำส่วนของ 5' upstream region มาวิเคราะห์หา transcription factor binding site ด้วย Alibaba2 Version 2.1 TRANSFAC 4.0 พบตำแหน่งที่คาดว่าจะเป็ Transcription binding site ทั้งหมด 25 ตำแหน่ง เช่น Hepatocyte nuclear factor 1 (HNF-1), Transcription factor Sp1 (Sp1) และ GATA-1, CCAAT-enhancer-bindings (C/EBPalp) เป็นต้น

แตกต่างที่บริเวณ intron 1 ที่ตำแหน่ง 389 ของ intron 1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ G/A ดังรูปที่ 25 ในขณะที่ intron 2 ตำแหน่ง 256 พบลำดับนิวคลีโอไทด์ AA/-T ดังรูปที่ 26

Y-F006-16	AGTTGAAGTCCCTATATTAACACCAAGGCGGATCAAGATTAT
Y-F006-17	AGTTGAAGTCCCTATATTAACACCAAGGCGGATCAAGATTAT
Y-F006-18	AGTTGAAGTCCCTATATTAACACCAAGGCGGATCAAGATTAT
Y-F006-19	AGTTGAAGTCCCTATATTAACACCAAGGCGGATCAAGATTAT
Y-F006-20	AGTTGAAGTCCCTATATTAACACCAAGGCGGATCAAGATTAT
Y-F006-S25	AGTTGAAGTCCCTATATTAACACCAAGGCGGATCAAGATTAT
Y-F054-16	AGTTGAAGTCCCTATATTAACACCAAGGCGGATCAAGATTAT
Y-F054-17	AGTTGAAGTCCCTATATTAACACCAAGGCGGATCAAAATTAT
Y-F054-18	AGTTGAAGTCCCTATATTAACACCAAGGCGGATCAAAATTAT
Y-F028-17	AGTTGAAGTCCCTATATTAACACCAAGGCGGATCAAAATTAT
Y-F028-18	AGTTGAAGTCCCTATATTAACACCAAGGCGGATCAAAATTAT
Y-F028-19	AGTTGAAGTCCCTATATTAACACCAAGGCGGATCAAGATTAT
Y-F028-20	AGTTGAAGTCCCTATATTAACACCAAGGCGGATCAAAATTAT
Y-F061-16	AGTTGAAGTCCCTATATTAACACCAAGGCGGATCAAGATTAT
Y-F061-18	AGTTGAAGTCCCTATATTAACACCAAGGCGGATCAAAATTAT
Y-F061-19	AGTTGAAGTCCCTATATTAACACCAAGGCGGATCAAGATTAT
Y-F061-20	AGTTGAAGTCCCTATATTAACACCAAGGCGGATCAAGATTAT
Y-F061-S25	AGTTGAAGTCCCTATATTAACACCAAGGCGGATCAAGATTAT

รูปที่ 25 เปรียบเทียบลำดับกรดนิวคลีโอไทด์บริเวณ intron1 ตำแหน่งที่ 389 ระหว่างกิ่งสายพันธุ์ด้านทานไวรัส (Y-F006-XX และ Y-054-XX) และสายพันธุ์ไม่ต้านทานไวรัส (P-F028-XX และ Y-F061-XX) เบสต่างแสดงด้วยตัวอักษรขาวแถบน้ำตาล

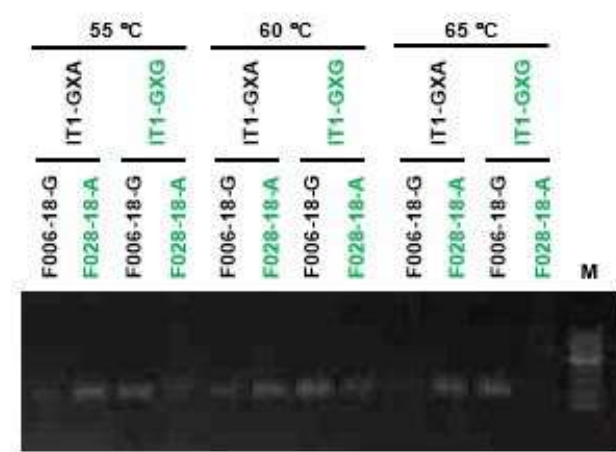
P-F006-21	TGAATTATTATGTGCGTGCAAGAATCTTTCATGTGTGATATATTA
P-F006-22	TGAATTATTATGTGCGTGCAAGAATCTTTCATGTGTGATATATTA
P-F006-23	TGAATTATTATGTGCGTGCAAGAATCTTTCATGTGTGATATATTA
P-F054-23	TGAATTATTATGTGCGTGCC-TGAATCTTTCATGTGTGATATATTA
P-F054-24	TGAATTATTATGTGCGTGCC-TGAATCTTTCATGTGTGATATATTA
P-F054-25	TGAATTATTATGTGCGTGCC-TGAATCTTTCATGTGTGATATATTA
P-F028-11	TGAATTATTATGTGCGTGCAAGAATCTTTCATGTGTGATATATTA
P-F028-13	TGAATTATTATGTGCGTGCAAGAATCTTTCATGTGTGATATATTA
P-F028-12	TGAATTATTATGTGCGTGCAAGAATCTTTCATGTGTGATATATTA
P-F028-25	TGAATTATTATGTGCGTGCAAGAATCTTTCATGTGTGATATATTA
P-F061-21	TGAATTATTATGTGCGTGCAAGAATCTTTCATGTGTGATATATTA
P-F061-22	TGAATTATTATGTGCGTGCAAGAATCTTTCATGTGTGATATATTA

รูปที่ 26 เปรียบเทียบลำดับกรดนิวคลีโอไทด์บริเวณ intron2 ตำแหน่งที่ 256 ระหว่างกิ่งสายพันธุ์ด้านทานไวรัส (P-F006-XX และ P-F054-XX) และสายพันธุ์ไม่ต้านทานไวรัส (P-F028-XX และ P-F061-XX) เบสต่างแสดงด้วยตัวอักษรขาวแถบน้ำตาล

4.8.2 การตรวจสอบความสัมพันธ์ของ SNP กับสายพันธุ์การต้านทานไวรัสหอ ร่า

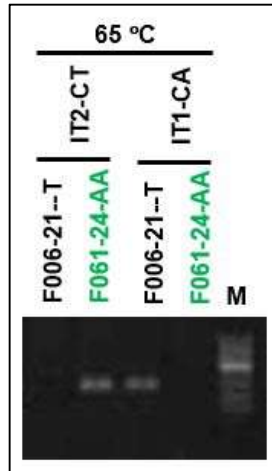
ทำการออกแบบ primer บริเวณปลาย 3' อยู่ตรงบริเวณ SNP จากนั้นทำ PCR โดยใช้ plasmid ของโคลนที่รู้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ SNP แล้วเป็น template เพื่อปรับสภาวะในการทำ PCR ให้

สามารถตรวจสอบโดยใช้ primer ได้ตรงตามลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ SNP โดยพบว่า ในตำแหน่ง intron 1 ต้องใช้ primer IT-1-GXA และ IT-1-GXG ซึ่งมีลำดับเบสบริเวณปลาย 3' เป็นเบส A และ G ที่สอดคล้องกับ SNP และให้เบสตำแหน่งที่ 3 จากปลายทางด้าน 3' เป็น mismatch และต้องใช้อุณหภูมิให้การ annealing ที่ 65 °C จึงจะสามารถตรวจ SNP ด้วย primer IT-1-GXA และ IT-1-GXG ได้ถูกต้องตามที่ เป็นจริง (รูปที่ 27)



รูปที่ 27 แสดงผลการปรับสภาวะการทำ PCR เพื่อตรวจ SNP ใน intron 1 ตำแหน่งที่ 389 (G/A) ด้วย primer IT-1-GXA ที่อุณหภูมิ 65°C

ส่วน SNP ใน intron 2 นั้นเมื่อออกแบบ primer บริเวณปลาย 3' อยู่ตรงบริเวณ SNP จากนั้นทำ PCR โดยใช้ plasmid ของโคลนที่รู้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ SNP แล้วเป็น template เพื่อปรับสภาวะในการทำ PCR ให้สามารถตรวจสอบโดยใช้ primer ได้ตรงตามลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ SNP ต้องใช้ primer IT-2-tCT และ IT-2-tCA ซึ่งมีลำดับเบสบริเวณปลาย 3' เป็นเบส CA และ CT ที่สอดคล้องกับ SNP และให้เบสตำแหน่งที่ 3 จากปลายทางด้าน 3' เป็น mismatch และต้องใช้อุณหภูมิให้การ annealing ที่ 65 °C จึงจะสามารถตรวจ SNP ด้วย primer IT-2-tCT และ IT-2-tCA ได้ถูกต้องตามที่ เป็นจริง (รูปที่ 28)



รูปที่ 28 แสดงผลการปรับสภาวะการทำ PCR เพื่อตรวจ SNP ใน intron 2 ตำแหน่งที่ 256 (AA-T) ด้วย primer IT-1-GXA ที่อุณหภูมิ 65°C

5. สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

ปัญหาการติดเชื้อมาก่อนโรค ทั้งไวรัสและแบคทีเรียยังคงเป็นปัญหาสำคัญสำหรับอุตสาหกรรม การเพาะเลี้ยงกุ้ง ซึ่งมีผลกระทบต่อการส่งออกกุ้งของประเทศไทยเป็นอย่างมาก มีความพยายามใช้เทคนิค ทางชีวโมเลกุลต่าง ๆ มากมายเพื่อวินิจฉัยและป้องกันการเกิดโรคระบาด แต่พบว่ายังไม่สามารถนำไปใช้ได้จริง ในการเพาะเลี้ยง ดังนั้นการเข้าใจกลไกการป้องกันโรคติดเชื้อในกุ้งจึงมีความจำเป็นเพื่อพัฒนาและส่งเสริมให้ กุ้งมีสุขภาพดีทนทานต่อโรคติดเชื้อต่อไป นอกจากนี้ จากการประสบความสำเร็จในการคัดเลือกสายพันธุ์ กุ้งขาวสายพันธุ์ต้านทานไวรัสทอราจึงชี้ให้เห็นว่า คัดเลือกสายพันธุ์กุ้งต้านทานโรคเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่จะ นำไปสู่การพัฒนาอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งอย่างยั่งยืน

โรคทอรา เป็นโรคที่ปัจจุบันไม่ค่อยเป็นปัญหากับการเพาะเลี้ยงกุ้งในหลายๆที่ เนื่องจาก ประสบความสำเร็จในการคัดสายพันธุ์กุ้งต้านทานไวรัสทอราได้ ปัจจุบัน พบโรคทอราเริ่มกลับมาสร้างปัญหา ในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวในจังหวัดเจียงซูของประเทศจีน (Shen et al., 2017) ซึ่งการพัฒนาสายพันธุ์กุ้ง ต้านทานโรค จำเป็นต้องมีการรักษาสายพันธุ์เพื่อให้คงคุณลักษณะที่ดีของการต้านทานไวรัสในรุ่นต่อไป งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษา ยีน *LvKLF* ซึ่งพบมีการแสดงออกต่ำในกุ้งสายพันธุ์ต้านทานไวรัสทอราในสภาวะปกติ เมื่อเทียบกับกุ้งสายพันธุ์ไม่ต้านทานไวรัสทอรา (Sookruksawong et al., 2013) ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า *LvKLF* เป็นคนละชนิดกับที่มีรายงานในกุ้งขาว กุ้งกุลาดำ และกุ้งก้ามกราม ที่มีรายงานก่อนหน้านี้ (Chang et al., 2012; Huang et al., 2014; Huang and Ren 2019) โดยพบ KLF ที่รายงานในกุ้ง ประกอบด้วย

ZnF_C2H2 จำนวน 3 domain อยู่บริเวณปลายด้านคาร์บอกซิล เหมือน KLF ที่พบในมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ในขณะที่ LvKLF ในงานวิจัยนี้ประกอบด้วย ZnF_C2H2 7 domain บริเวณปลายด้านอะมิโน ซึ่งมีรายงานการจัดกลุ่มของ KLF ได้เป็น 3 กลุ่มคือ triple-fingered multi-adjacent-fingered และ separated-paired-fingered (Iuchhi, 2001)

triple-fingered หรือ trip-C2H2 (tC2H2) จะประกอบด้วย ZnF_C2H2 จำนวน 3 domain ที่ปลายคาร์บอกซิล โดยจะพบ ZnF_C2H2 domain 1 แตกต่างจาก ZnF_C2H2 ใน domain ที่ 2 และ 3 ซึ่งให้เห็นว่า ZnF_C2H2 domain ที่ 1 น่าจะมีการจับกับ DNA ที่แตกต่างกับ domain ที่ 2 และ 3 นอกจากนี้พบว่า domain ที่ 1 จับ DNA ด้วย K⁺ เพียง residue เดียว ในขณะที่ domain 2 และ 3 จับด้วย 4 และ 3 residue ตามลำดับ (Yokono et al., 1998) โปรตีนในกลุ่มนี้ได้แก่ KLF จากมนุษย์ และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จะพบ finger protein จับกับ GATA-1, SP1 (Merika et al., 1995) zinc finger เหล่านี้สามารถจับกับ protein-DNA, protein-protein และ RNA Multiple-adjacent-C2H2 (maC2H2) Zinc fingers โปรตีนในกลุ่มนี้จะประกอบด้วย 4 ZnF_C2H2 domain หรือมากกว่า ซึ่งพบมากถึง 30 Zinc fingers (Mark et al., 1999) Zinc finger กลุ่มนี้นอกจากจับกับ RNA ได้ดีเหมือน DNA ยังสามารถจับกับ dsRNA และ RNA-DNA hybrid ได้ดีอีกด้วย (Yang et al., 1999; Morgan et al., 1997; Finerty et al., 1997) โปรตีนในกลุ่มนี้เช่น JAZ (4 fingers) (Yang et al., 1999), dsRBP-Zfa (7 fingers) (Finerty et al., 1997) และ TFIIIA (9 fingers) (Foster et al., 1997) ส่วน separated-paired-C2H2 (spC2H2) zinc fingers จะประกอบด้วย ZnF_C2H2 เป็นคู่ 1 ถึง 3 คู่ ส่วน linker ไม่ใช่ TGERP แบบใน tC2H2 และ maC2H2 แต่จะเป็น KRNKVPYV โปรตีนในกลุ่มนี้เช่น Tramtrack (TTK), Shn และ basonuclin เป็นต้น (Fairall et al., 1993; Kuhnlein et al., 1994; Iuchi and Green, 1999) ซึ่ง LvKLF ที่รายงานในงานวิจัยนี้จัดอยู่ในกลุ่มของ maZnF_C2H2 โดยพบแสดงออกมากที่สุด ใน hemocyte ซึ่งแตกต่างกับ MrKLF และ PmKLF ซึ่งเป็นกลุ่ม tZnF_C2H2 ที่มีการแสดงออกของยีนนี้มากในเหงือกและ ลำไส้ ตามลำดับ (Huang and Ren, 2019; Chang et al., 2012)

จากรายงานที่ผ่านมาพบว่าเมื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmKLF* และ *LvKLF* ในกลุ่ม tZnF_C2H2 ในกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV พบว่า กุ้งชะลอการเข้าสู่สภาวะ moribund และพบว่ามีจำนวน copy number ของไวรัสลดลงซึ่งให้เห็นว่า *PmKLF* และ *LvKLF* ชนิด ZnF_C2H2 ช่วยทำให้มีการติดเชื้อ WSSV ในกุ้ง (Huang et al., 2014; Chang et al., 2012) ซึ่งเมื่อพิจารณา LvKLF ชนิด maZnF_C2H2 ที่รายงานในงานวิจัยนี้ พบว่ามีการแสดงออกต่ำในกุ้งสายพันธุ์ด้านทานไวรัสทอรา และพบว่า LvKLF มีปฏิสัมพันธ์กับ

non-structural protein ได้แก่ BIR, Helicase และ RNA-dependent RNA polymerase และ structural protein ได้แก่ VP2 และ VP3 ซึ่งสอดคล้องกับ LvLKF จากกลุ่ม tZnF_C2H2 ที่มีปฏิสัมพันธ์กับ IE1 ซึ่งเป็นยีนของ WSSV (Huang et al., 2014) ยิ่งไปกว่านั้น เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน LvLKF ชนิด maZnF_C2H2 ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ในกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV ที่เวลาต่าง ๆ กัน พบยีนมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 และสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 และลดต่ำลงที่ชั่วโมงที่ 48 หลังการติดเชื้อเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย PBS (Supungul et al., unpublished data) ซึ่งให้เห็นว่า LvLKF ชนิด maZnF_C2H2 น่าจะมีส่วนช่วยไวรัสทอราในการเข้าสู่เซลล์ ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้จะนำไปสู่การพัฒนาเพื่อป้องกันการติดเชื้อก่อโรคในกุ้งต่อไป นอกจากนี้ การแสดงออกของยีน LvLKF ชนิด maZnF_C2H2 ที่ต่ำในกุ้งที่ต้านทานไวรัสทอรา แสดงให้เห็นว่า การแสดงออกของยีนนี้สามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกรอบครัวกุ้งที่ต้านทานไวรัสทอราได้

เอกสารอ้างอิง

- Argue BJ, Arce SM, Lotz JM, Moss SM. 2002. Selective breeding of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) for growth and resistance to Taura Syndrome Virus. *Aquaculture*. 204,447-60.
- Chang LK, Huang PH, Shen WT, Yang SH, Liu WJ, Lo CF. 2012. Role of *Penaeus monodon* Kruppel-like factor (*PmKLF*) in infection by white spot syndrome virus. *Developmental and comparative immunology*. 36,121-129.
- Cock J, Gitterle T, Salazar M, Rye M. 2009. Breeding for disease resistance of Penaeid shrimps. *Aquaculture*. 286,1-11.
- Dang DT, Pevsner J, Yang VW. 2000. The biology of the mammalian Kruppel-like family of transcription factors. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 32,1103-1121.
- Diez-Tascon, C., Keane, O.M., Wilson, T., Zadissa, A., Hyndman, D.L., Baird, D.B., McEwan, J.C., Crawford, A.M. 2005. Microarray analysis of selection lines from outbred populations to identify genes involved with nematode parasite resistance in sheep. *Physiol Genomics* 21, 59-69.
- Fairall, L., Schwabe, J.W., Chapman, L., Finch, J.T., Rhodes, D. 1993. The crystal structure of a two zinc-finger peptide reveals an extension to the rules for zinc-finger/DNA recognition. *Nature* 366, 483-487.

- Finerty, P., Jr. and Bass, B.L. 1997. A *Xenopus* zinc finger protein that specifically binds dsRNA and RNA-DNA hybrids. *Journal of Molecular Biology* 271, 195-208.
- Flegel, T.W. 2006. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture*. 258, 1-33.
- Flegel, T.W., Nielsen, L., Thamavit, V., Kongtim, S., Pasharawipas, T. 2004. Presence of multiple viruses in non-diseased, cultivated shrimp at harvest. *Aquaculture*. 240, 55-68.
- Foster, M.P., Wuttke, D.S., Radhakrishnan, I., Case, D.A., Gottesfeld, J.M., Wright, P.E. 1997. Domain packing and dynamics in the DNA complex of the N-terminal zinc fingers of TFIIIA. *Nat Struct Biol* 4, 605-608.
- Gomez-Gil, B., Soto-Rodriguez, S., Garcia-Gasca, A., Roque, A., Vazquez-Juarez, R., Thompson F.L., Swings, J. 2004, Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology* 150,1769-1777.
- Huang, P.H., Lu, S.C., Yang, S.H., Cai, P.S., Lo, C.F., Chang, L.K. 2014. Regulation of the immediate-early genes of white spot syndrome virus by *Litopenaeus vannamei* kruppel-like factor (LvKLF). *Developmental and comparative immunology* 46, 364-372.
- Huang, Y., Ren, Q. 2019. A kruppel-like factor from *Macrobrachium rosenbergii* (MrKLF) involved in innate immunity against pathogen infection. *Fish and Shellfish Immunology* 95, 519-527.
- Iuchi, S. 2001. Three classes of C2H2 zinc finger protein. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences* 58, 625-635.
- Iuchi, S., Green, H. 1999. Basonuclin, a zinc finger protein of keratinocytes and reproductive germ cells, binds to the rRNA gene promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96, 9628-9632.
- Jensen, K., Paxton, E., Waddington, D., Talbot, R., Darghouth, M.A., Glass, E.J. 2008. Differences in the transcriptional responses induced by *Theileria annulata* infection in bovine monocytes derived from resistant and susceptible cattle breeds. *Int J Parasitol* 38, 313-325.
- Kaczynski, J., Cook, T., Urrutia, R. 2003. Sp1- and Kruppel-like transcription factors. *Genome biology*.

4, 206.

- Kuhnlein, R.P., Frommer, G., Friedrich, M., Gonzalez-Gaitan, M., Weber, A., Wagner-Bernholz, J.F., Gehring, W.J., Jackle, H., Schuh, R. 1994. Spalt encodes an evolutionarily conserved zinc finger protein of novel structure which provides homeotic gene function in the head and tail region of the *Drosophila* embryo. *EMBO J.* 13, 168-179.
- Lightner, D.V., Redman, R.M., Pantoja, C.R., Noble, B.L., Tran, L.H. 2012. Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. *The Global Aquaculture Advocate* 40.
- Mari, J., Poulos, B.T., Lightner, D., Bonami, J.R. 2002. Shrimp taura syndrome virus: genomic characterization and similarity with members of the genus *Cricket paralysis*-like viruses. *Journal of General Virology* 83, 915 – 926.
- Mark, C., Abrink, M., Hellman, L. 1999. Comparative analysis of KRAB zinc finger protein in rodents and man: evidence for several evolutionarily distinct subfamilies of KRAB zinc finger genes. *DNA cell Biological* 18, 381-396
- Merika, M., Orkin, S., 1995. Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the kruppel family proteins Sp1 and EKLF. *Molecular Cellular Biology* 15, 2437-2447.
- Morgan, B., Sun, L., Avitahl, N., Andrikopoulou, K., Ikeda, T., Gonzales, E., Wu, P., Nebe, S., Georgopoulos, K. 1997. Aiolos, a lymphoid restricted transcription factor that interact with Ikaros to regulate lymphocyte differentiation. 1997. *EMBO journal* 16, 2004-2013.
- Moss, D.R., Arce, S.M., Otoshi, C.A., Moss, S.M. 2011. Shrimp breeding for resistance to Taura syndrome virus. *The Global Aquaculture Advocate* 40–41.
- O'Gorman, G.M., Park, S.D., Hill, E.W., Meade, K.G., Coussens, P.M., Agaba, M., Naessens, J., Kemp, S.J., MacHugh, D.E. 2009. Transcriptional profiling of cattle infected with *Trypanosoma congolense* highlights gene expression signatures underlying trypanotolerance and trypanosusceptibility. *BMC Genomics* 10: 207.

- Ohnesorge, N., Viemann, D., Schmidt, N., Czymai, T., Spiering, D., Schmolke, M., Ludwig, S., Roth, J., Goebeler, M. Schmidt, M. 2010. Erk5 activation elicits a vasoprotective endothelial phenotype via induction of Kruppel-like factor 4 (KLF4). *Journal of Biological Chemistry* 285(34), 26199-26210.
- Pearson, R., Fleetwood, J., Eaton, S., Crossley, M., Bao, S. 2008. Kruppel-like transcription factors: a functional family. *The international journal of biochemistry & cell biology* 40, 1996-2001.
- Poulos, B.T., Tang, K.F.J., Pantoja, C.R., Bonami, J.R., Lightner, D.V. 2006. Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. *Journal of General Virology* 87, 987-996.
- Preiss, A., Rosenberg, U.B., Kienlin, A., Seifert, E., Jackle, H. 1985. Molecular genetics of Kruppel, a gene required for segmentation of the *Drosophila* embryo. *Nature* 313, 27-32.
- Schuieler, M., Hilger-Eversheim, K., Dobner, T., Bosserhoff, A.K., Moser, M., Turner, J., Crossley, M., Buettner, R. 2001. Induction of AP-2alpha expression by adenoviral infection involves inactivation of the AP-2rep transcriptional corepressor CtBP1. *The Journal of biological chemistry* 276, 27944-2799.
- Senapin, S., Phewsaiya, K., Briggs, M., Flegel, T.W. 2007. Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. *Aquaculture*. 266, 32-38.
- Shen, H., Jiang, G., Wan, X., Fan, X., Qiao, Y., Shi, W., Li, H., Wang, L. 2017. Multiple pathogens prevalent in shrimp *Penaeus vannamei* cultured from greenhouse ponds in Jiangsu province of China. *Journal of Aquaculture Research and development*. 8(10), 510.
- Sookruksawong, S., Sun, F., Liu, Z., Tassanakajon, A. 2013. RNA-Seq analysis reveals genes associated with resistance to Taura syndrome virus (TSV) in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Developmental and comparative immunology* 41, 523-533.
- Suske, G., Bruford, E., Philipsen, S. 2005. Mammalian SP/KLF transcription factors: bring in the family. *Genomics*. 85, 551-556.

- Wieschaus, E., Nusslein-Volhard, C., Kluding, H. 1984. Kruppel, a gene whose activity is required early in the zygotic genome for normal embryonic segmentation. *Developmental Biology* 104,172-186.
- Yang, V.W. 1998. Eukaryotic transcription factors: identification, characterization and functions. *The Journal of nutrition*. 128, 2045-2051.
- Yang, M., May, W.S., Ito, T. 1999. JAZ requires the double-stranded RNA-binding zinc finger motifs for nuclear localization. *Journal Of Biological Chemistry* 274, 27399-27406.
- Yokono, M., Saegusa, N., Matsushita, K., Sugiura, Y. 1998. Unique DNA binding mode of the N-terminal zinc finger of transcription factor Sp1. *Biochemistry* 37, 6824-6832.
- Zhang, W., Bieker, J.J. 1999. Acetylation and modulation of erythroid Kruppel-like factor (EKLF) activity by interaction with histone acetyltransferases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95, 9855-9860.
- Zhang, Z., Niu, C., Storset, A., Bogwald, J., Dalmo, R.A. 2011. Comparison of *Aeromonas salmonicida* resistant and susceptible salmon families: A high immune response is beneficial for the survival against *Aeromonas salmonicida* challenge. *Fish Shellfish Immunol* 31, 1-9.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ
 - อยู่ระหว่างจัดทำ manuscript
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - เชิงพาณิชย์ (มีการนำไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ/บุคคลทั่วไป)
 - เชิงนโยบาย (มีการกำหนดนโยบายอิงงานวิจัย/เกิดมาตรการใหม่/เปลี่ยนแปลงระเบียบข้อบังคับหรือวิธีทำงาน)
 - เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง)
 - เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)
3. อื่นๆ (เช่น หนังสือ การจดสิทธิบัตร)