

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์  
โครงการส่งเสริมการทำงานวิจัยเชิงลึกในสาขาวิชาที่มีศักยภาพสูง  
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

---

โครงการวิจัย  
เรื่อง

“โครงการวิจัยนำร่องอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งที่ยั่งยืน: เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อ  
การเลี้ยงกุ้งระบบปิดครบวงจร”

“Preliminary Research for Sustainable Shrimp Aquaculture: Biotechnology  
for Closed and Super-intensive Culture System”

คณะผู้วิจัย

ศาสตราจารย์ ดร. อัญชติ ทัศนากจร

ดร. สิริพร พงษ์สมบูรณ์

ดร. ปิติ อ่ำพ่าย

น.ส. สุรรัตน์ แซ่ตั้ง

ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอนุชีววิทยาและจีโนมกุ้ง  
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “โครงการวิจัยนำร่องอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งที่ยั่งยืน: เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการเลี้ยงกุ้งระบบปิดครบวงจร” “Preliminary Research for Sustainable Shrimp Aquaculture: Biotechnology for Closed and Super-intensive Culture System” (สัญญาเลขที่ CU-CLUSTER-Food -๓-๓๕-๕๓) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก โครงการส่งเสริมการทำงานวิจัยเชิงลึกในสาขาวิชาที่มีศักยภาพสูง กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช หรือ CU-CLUSTER-FUND

## บทคัดย่อ

โครงการนี้เป็นการวิจัยนำร่องเพื่อการเพาะเลี้ยงกุ้งอย่างยั่งยืน โดยใช้ความรู้ด้านเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วยในการเลี้ยงกุ้งในระบบปิด งานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาด้านพันธุศาสตร์และชีววิทยาโมเลกุลของกุ้ง โดยเฉพาะการศึกษายีนในระบบภูมิคุ้มกัน ในสองกลุ่มงานวิจัยหลัก ซึ่งมีหัวข้อวิจัยคือ (1) การวิเคราะห์การทำงานของยีนในระบบโพรฟีนอลออกซิเดสในกุ้ง และ (2) การค้นหายีนที่แสดงออกในการตอบสนองต่อเชื้อโรคโดยวิธี cDNA microarray

จากการตรวจสอบหน้าที่ของยีน *PmPPAE 2* และ *PmLGBP* ในระบบโพรฟีนอลออกซิเดส และระบบภูมิคุ้มกันกุ้ง ได้ยับยั้งการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค RNA interference พบว่าเมื่อลดการแสดงออกของยีน *PmPPAE 2* หรือ *PmLGBP* ในกุ้ง ส่งผลให้ฟีนอลออกซิเดสแอคติวิตีลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmPPAE 2* พบว่ากุ้งมีอัตราการตายเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ หลังติดเชื้อ *Vibrio harveyi* ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของจำนวนแบคทีเรียในเลือดกุ้ง นอกจากนี้ ได้ผลิตโปรตีนในอีโคโนส เพื่อศึกษาหน้าที่ทางชีวภาพของโปรตีน *PmLGBP* พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน *PmLGBP* สามารถจับได้อย่างจำเพาะกับ LPS และ beta-glucan แต่ไม่จับกับ peptidoglycan ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ยีน *PmPPAE2* และ *PmLGBP* เป็นยีนที่มีหน้าที่ในระบบโพรฟีนอลออกซิเดส และเป็นระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญในกุ้ง

ในส่วนของการค้นหายีนที่ตอบสนองต่อสภาวะติดเชื้อด้วยเทคนิค cDNA microarray พบยีนของกุ้งกุลาดำ ที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการต่อต้านการติดเชื้อไวรัส WSSV ไวรัส YHV และ แบคทีเรีย *V. harveyi* โดยกุ้งติดเชื้อ WSSV มีผลทำให้ยีนมีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปเป็นจำนวนมากเมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งติดเชื้อไวรัส YHV และ แบคทีเรีย *Vibrio* อย่างไรก็ตามยีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นในกุ้งติดเชื้อมีทั้งยีนที่ทำหน้าที่ในการต่อต้านการติดเชื้อ และ ยีนที่ไวรัสใช้ประโยชน์ในการก่อโรคในกุ้ง การศึกษานี้ช่วยบ่งชี้ยีนที่น่าจะนำไปศึกษาต่อเพื่อให้เข้าใจในกระบวนการต้านไวรัสหรือแบคทีเรียมากยิ่งขึ้น โดยความรู้ที่ได้จากการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ในการเข้าใจระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง ทำให้สามารถหาแนวทางสำหรับการควบคุมโรคในการเลี้ยงกุ้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ

## Abstract

This project is a preliminary research in biotechnology for sustainable shrimp aquaculture in the closed culture system. This research focuses on genetics and molecule biology of shrimp in particular the study of genes involved in shrimp immune system. The research topics are (1) functional analysis of genes in the prophenoloxidase activating system (proPO system) of shrimp and (2) identification of genes expressed in response to pathogen by cDNA microarray approach.

To investigate the potential role of the proPO-activating enzyme 2 (*PmPPAE2*) and the lipopolysaccharide and  $\beta$ -1,3-glucan binding protein (*PmLGBP*) genes in the shrimp proPO system and immune defense, gene silencing was performed by RNA interference. Knockdown of *PmPPAE2* or *PmLGBP* genes resulted in a significant reduction of phenoloxidase activity. Moreover, silencing of *PmPPAE2* gene significantly increased the mortality of *Vibrio harveyi* infected shrimp, which correlated with an increase in the number of bacteria in the hemolymph. To further characterize the biological function of the *PmLGBP* protein, mature protein was expressed in *E. coli*. The recombinant *PmLGBP* protein displays specific binding activity to lipopolysaccharide (LPS) and beta-glucan, but not peptidoglycan. These results indicate that *PmPPAE2* and *PmLGBP* function in the proPO system and are important components in the shrimp immune system.

Microarray analysis of differentially expressed genes in shrimp hemocytes revealed a number of genes that were implicated in the shrimp defense against three major pathogens, two virus (WSSV and YHV) and one bacteria (*V. harveyi*). WSSV infection could alter the expression of a wide range of shrimp genes when compared to that induced by YHV or *V. harveyi* infection. However, the induced genes in viral infection represent those that are of benefit to the viral propagation as well as those that are important for host defense. The present study provides some clues for genes worthy of further study to understand the antiviral and antibacterial mechanisms of shrimps. The knowledge gained from this research will be useful for an understanding of the shrimp immune system which can be applied for effective disease control in shrimp aquaculture.

## สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

เรื่อง	หน้า
ปกหน้า	
กิตติกรรมประกาศ	II
บทคัดย่อภาษาไทย	III
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	IV
สารบัญเรื่อง	V
สารบัญตาราง	VII
สารบัญภาพ	VIII
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	IX
คำนำ ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	I
โครงการย่อยที่ 1: การวิเคราะห์หน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบโพรพีนอลออกซิเดสในกิ้งกูดำ	3
1.1 คำนำ	3
1.2 วิธีดำเนินการวิจัย	4
- ค้นหาหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบ โพรพีนอลออกซิเดส	4
- ศึกษาหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ โพรพีนอลออกซิเดสโดยใช้เทคนิค RNA interference	4
1.3 ผลของการวิจัย	6
- การศึกษาลักษณะสมบัติของยีน <i>PmPPAE2</i> และ <i>PmLGBP</i>	6
- การศึกษาหน้าที่ของยีน <i>PmPPAE2</i> และ <i>PmLGBP</i> โดยใช้เทคนิค RNA interference	8
- อัตราการตายของกิ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน <i>PmPPAE2</i>	8
- จำนวนของเชื้อ <i>V. harveyi</i> ในกิ้งกูดำที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RNAi	9
- การสร้างและผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของยีน <i>PmLGBP</i>	10
- การจับกันของโปรตีน <i>PmLGBP</i> กับผนังเซลล์จุลชีพ	11
- การกระตุ้นระบบ โพรพีนอลออกซิเดสในเมดเลือดกิ้งกูดำด้วยโปรตีน <i>PmLGBP</i>	12
1.4 วิจารณ์ผลของการวิจัย	13

1.5 สรุปผลของการวิจัย	15
โครงการย่อยที่ 2: การค้นหายีนในกิ่งกลาดำที่ตอบสนองต่อสภาวะติดเชื้อมด้วย cDNA microarray	16
2.1 คำนำ	16
2.2 วิธีดำเนินการวิจัย	17
- ตัวอย่างทดลอง	17
- การไฮบริไดซ์ cDNA microarray slide และการวิเคราะห์ expression profile	17
- ยืนยันผลที่ได้จากการทำ microarray ด้วย real time RT-PCR	17
2.3 ผลของการวิจัย	18
- รูปแบบการแสดงออกของยีนในกิ่งติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย	18
- ยืนยันผลที่ได้จากการทำ microarray ด้วย real time RT-PCR	25
2.4 วิจารณ์ผลของการวิจัย	25
- ยีนกลุ่ม defense & homeostasis ที่แสดงออกเพิ่มขึ้น	26
- ยีนกลุ่ม cell cycle/DNA synthesis, repair & replication ที่แสดงออก เพิ่มขึ้น	27
- ยีนกลุ่ม signaling & communication ที่แสดงออกเพิ่มขึ้น	27
- ยีนกลุ่ม gene expression, regulation & protein synthesis ที่แสดงออก เพิ่มขึ้น	28
- ยีนกลุ่ม energy & metabolism ที่แสดงออกเพิ่มขึ้น	28
- ยีนกลุ่ม structural & cytoskeleton related protein ที่แสดงออก เพิ่มขึ้น	29
- ยีนกลุ่ม transport ที่แสดงออกเพิ่มขึ้น	29
2.4 สรุปผลของการวิจัย	30
บรรณานุกรม	31
ภาคผนวก	35
ประวัตินักวิจัย และคณะ	36

## สารบัญตาราง (List of Tables)

ตาราง		หน้า
ตารางที่ 1	รายละเอียดของไพรเมอร์ และ อุณหภูมิที่ใช้ annealing	18
ตารางที่ 2	ยีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นในกุ้งติดเชื้อไวรัส WSSV, YHV และแบคทีเรีย <i>Vibrio</i>	21
ตารางที่ 3	ยืนยันผลการทำ microarray ด้วย real time RT-PCR	25

## สารบัญญภาพ (List of Illustration)

		หน้า
รูปที่ 1	ภาพรวมของแนวทางการวิจัยและพัฒนาเพื่อนำไปสู่การเลี้ยงกุ้งแบบ ครบวงจรชีวิตในระบบการเลี้ยงแบบปิดความหนาแน่นสูง	2
รูปที่ 1.1	ลักษณะสมบัติของยีน <i>PmPPAE2</i> , ลำดับกรดอะมิโนของ <i>PmPPAE2</i> และ โครงสร้างโดเมนที่พบใน <i>PmPPAE2</i> ของกุ้งกุลาดำ	7
รูปที่ 1.2	ลักษณะสมบัติของยีน <i>PmLGBP</i> , ลำดับกรดอะมิโนของ <i>PmLGBP</i> และ โครงสร้างโดเมนที่พบใน <i>PmLGBP</i> ของกุ้งกุลาดำ	7
รูปที่ 1.3	การแสดงออกของยีน <i>PmPPAE2</i> และ <i>PmLGBP</i> ในเลือดของกุ้ง กุลาดำที่ถูกฉีดด้วย <i>PmPPAE2</i> dsRNA หรือ <i>PmLGBP</i> dsRNA หรือ GFP dsRNA หรือสารละลาย NaCl	8
รูปที่ 1.4	เอกทิวติของ phenoloxidase ในเลือดของกุ้งกุลาดำที่ถูกยับยั้งการ แสดงออกของยีน <i>PmPPAE2</i> และ <i>PmLGBP</i> ด้วยเทคนิค RNAi	9
รูปที่ 1.5	อัตราการตายของกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนและกระตุ้นด้วย การฉีดเชื้อ <i>V. harveyi</i>	10
รูปที่ 1.6	จำนวนของเชื้อ <i>V. harveyi</i> 639 (CFU/ml) ในเลือดของกุ้งที่ถูกยับยั้ง การแสดงออกของยีน <i>PmPPAE2</i> ( <i>PmPPAE2</i> dsRNA)	11
รูปที่ 1.7	การวิเคราะห์โปรตีนรีคอมบิแนนท์ <i>PmLGBP</i> ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ แล้ว ด้วยเทคนิค SDS-PAGE	11
รูปที่ 1.8	การจับกันของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ <i>PmLGBP</i> กับ $\beta$ -glucan, LPS และ PNG	12
รูปที่ 1.9	เอกทิวติของ phenoloxidase ในเม็ดเลือด (HLS) ของกุ้งกุลาดำที่บ่ม กับ r <i>PmLGBP</i>	13
รูปที่ 2.1	จำนวนยีนที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัส WSSV, ไวรัส YHV และ แบคทีเรีย <i>V. harveyi</i> ในแต่ละเวลาที่ทำการทดสอบ	19
รูปที่ 2.2	การกระจายตัวของยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นตามหน้าที่	20



## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

คำย่อ	คำอธิบาย
AMPs	antimicrobial peptides
BSA	bovine serum albumin
LGBP	$\beta$ -1,3-glucan binding protein
CAC	cacodylate
EST	expressed sequence tag
GFP	green fluorescent protein
GILT	gamma-interferon-inducible-lysosomal thiol reductase
GRN	growth factor progranulin
HLS	hemocyte lysate supernatant
HPV	human papillomavirus
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyphenylalanine
LPS	lipopolysaccharide
PGN	peptidoglycan
PRPs	pattern recognition proteins
proPO	prophenoloxidase
PPAE	proPO-activating enzyme
ROS	reactive oxygen species
SP	serine proteinase
TBS	tris buffered saline
TSV	Taura syndrome virus
WSSV	white Spot Syndrome Virus
YHV	yellow-head virus

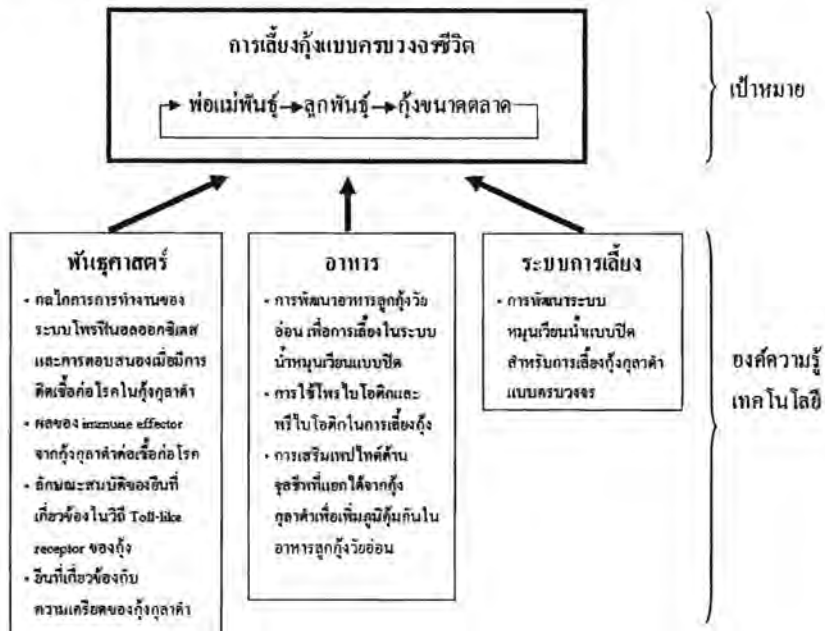
## คำนำ ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งมีความสำคัญมากต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย เพราะสามารถทำรายได้เข้าประเทศมากกว่า 50,000 ล้านบาทต่อปี (กรมศุลกากร, <http://www.customs.go.th>) และเกิดการจ้างแรงงานมากกว่า 1 ล้านคน จึงมีการพัฒนาการเลี้ยงกุ้งไปสู่การเลี้ยงแบบหนาแน่นสูงในระบบปิด (closed and super-intensive culture system) ซึ่งให้ผลผลิตต่อพื้นที่ที่สูงขึ้นมา เพื่อควบคุมและป้องกันปัญหาทางด้านโรค คุณภาพน้ำ สิ่งแวดล้อม และกฎเกณฑ์ความปลอดภัยของผู้บริโภค ทั้งยังเป็นระบบเลี้ยงกุ้งที่มีผลผลิตแน่นอนและควบคุมได้ การวิจัยและพัฒนา เพื่อสนับสนุนการเลี้ยงกุ้งให้มีความยั่งยืน จึงมีความสำคัญเป็นอย่างมากต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย

คณะวิจัยจากศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอนุชีววิทยาและจีโนมกุ้งและศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ร่วมหารือและระดมความคิดจนได้ข้อสรุปร่วมกันว่า การพัฒนาอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งให้มีความยั่งยืนนั้น จะต้องมีการปรับเปลี่ยนระบบการเลี้ยงเป็นระบบการเลี้ยงกุ้งแบบครบวงจร ที่ตั้งอยู่บนพื้นฐานเทคโนโลยีที่สำคัญสามด้าน คือ พันธุ์ อาหาร และระบบการเลี้ยง (ภาพที่ 1) กล่าวได้ว่า การคัดเลือกสายพันธุ์กุ้งที่ดีจากการนำเทคโนโลยีทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลมาใช้ การพัฒนาอาหารที่มีรูปแบบเฉพาะและเหมาะสม และการนำระบบการเลี้ยงความหนาแน่นสูงที่สามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมให้เหมาะต่อการเจริญเติบโต และการเจริญพันธุ์ของกุ้งได้ จะเป็นสิ่งที่ช่วยให้การเลี้ยงกุ้งสามารถก้าวไปสู่ระบบการเลี้ยงแบบอุตสาหกรรมครบวงจร ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และตอบสนองต่อความต้องการในการพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศได้เป็นอย่างดี

แม้ว่าการเลี้ยงในระบบปิดจะช่วยให้สามารถควบคุมโรคได้ดี แต่การเลี้ยงกุ้งในระบบการเลี้ยงแบบปิดที่ความหนาแน่นสูง จะทำให้กุ้งเกิดความเครียดและเป็นโรคได้ง่ายเช่นกัน จึงต้องการสายพันธุ์กุ้งที่ทนต่อสภาวะเครียดและทนทานต่อโรค ที่ผ่านมา ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอนุชีววิทยาและจีโนมกุ้ง ได้ศึกษาวิจัยโดยมุ่งเน้นการสร้างองค์ความรู้เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งมาอย่างต่อเนื่อง เพื่อนำองค์ความรู้ไปใช้แก้ปัญหาโรคระบาดและการปรับปรุงสายพันธุ์ โดยทำการแยกและศึกษาชิ้นที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ และเก็บรวบรวมข้อมูลยีนเหล่านี้ในฐานข้อมูล Expressed sequence tag (EST) ของกุลาดำ (<http://pmonodon.biotech.or.th>) (Tassanakajon และคณะ 2006) นอกจากนี้ ยังได้พัฒนา cDNA microarray chip สำหรับการตรวจหายีนที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัส (Wongpanya และคณะ 2007; Pongsomboon และคณะ 2008) เพื่อศึกษาหน้าที่และกลไกการต้านโรคของยีนในระบบภูมิคุ้มกัน ศึกษาวิธีการตอบสนองต่อเชื้อในกระบวนการต่าง ๆ เช่น การสร้างเมลา닌ในระบบโพर्फินอลออกซิเดส (Amparyup และคณะ 2009; Charoensupsri และคณะ 2009) การสังเคราะห์เพปไทด์ต้านจุลชีพชนิดต่าง ๆ ที่ออกฤทธิ์ฆ่าหรือยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย รา และไวรัส (Somboonwivat และคณะ 2005; Supungul และคณะ 2008; Amparyup และคณะ 2008; Ponprateep และคณะ 2009; Tharntada

และคณะ 2009) รวมถึงตัวรับยังซีรีน โปรตีนสที่หลังจากเซลล์เม็ดเลือด เพื่อควบคุม โปรตีนสใน กระบวนการทางชีวภาพ และ/หรือควบคุม โปรตีนสของเชื้อที่รุกราน (Somprasong และคณะ 2006; Donpudsa และคณะ 2009)



**รูปที่ 1** ภาพรวมของแนวทางการวิจัยและพัฒนาเพื่อนำไปสู่การเลี้ยงกุ้งแบบครบวงจรชีวิตในระบบการเลี้ยงแบบปิดความหนาแน่นสูง

คณะวิจัยจึงได้มุ่งเน้นศึกษาการตอบสนองต่อเชื้อของโปรตีนสำคัญ ๆ ในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง เพื่อให้เข้าใจถึงกลไกการทำงานของโปรตีนเหล่านี้ในการต่อต้านการติดเชื้อ พัฒนาและประยุกต์องค์ความรู้เกี่ยวกับโปรตีนเพื่อช่วยในการควบคุมโรค รวมถึงการพัฒนาองค์ความรู้เกี่ยวกับยีนที่ตอบสนองต่อความเครียดในสภาวะเลี้ยงในระบบปิด นอกจากนี้ ยังพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ และวิธีการตรวจคัดเลือกลูกพันธุ์กุ้งที่เหมาะสมกับการเลี้ยงในระบบปิด เช่น กุ้งที่สามารถทนสภาวะการเลี้ยงที่ความเค็มต่ำ กุ้งที่ทนต่อความเครียดจากปริมาณไนเตรท เป็นต้น และพัฒนาระบบของเครื่องหมายพันธุกรรมและเทคนิคการตรวจให้มีประสิทธิภาพสูง มีความถูกต้องและแม่นยำ รวมทั้งการพัฒนา DNA chip เพื่อติดตามสุขภาพกุ้ง

โครงการนี้เป็นโครงการวิจัยนอกรอบเพื่อศึกษาในด้านพันธุศาสตร์ในประเด็นสำคัญ ๆ คือ การค้นหาและศึกษาหน้าที่ของยีนในระบบโปรตีนออกซิเดส เพื่อนำไปสู่การเข้าใจกลไกการทำงานของยีนในระบบนี้ในกุ้งกุลาดำ และการค้นหายีนกุ้งกุลาดำที่ตอบสนองต่อสภาวะติดเชื้อด้วยเทคนิค cDNA microarray

# โครงการย่อยที่ 1: การวิเคราะห์หน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบโพรฟีโนลออกซิเดสในกิ้งกูดดำ

## 1.1 คำนำ

การสร้างเมลานิน (melanization) เกิดขึ้นโดยระบบโพรฟีโนลออกซิเดส (prophenoloxidase: proPO) ซึ่งเป็นระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญระบบหนึ่งในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง กระบวนการนี้สามารถถูกกระตุ้นด้วยเชื้อจุลินทรีย์ โดยเอนไซม์ phenoloxidase (PO) ทำหน้าที่เปลี่ยนสารประกอบ phenol ให้เป็น quinone ซึ่งเป็นตัวกลางสำคัญต่อกระบวนการสร้างเมลานินเพื่อทำลายเชื้อโรค กลไกการกระตุ้นระบบโพรฟีโนลออกซิเดส เริ่มต้นจากโปรตีน Pattern recognition proteins ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ของเชื้อโรค และกระตุ้นการทำงานของ serine proteinase (SP) cascade ซึ่งจะกระตุ้นเอนไซม์ proPO-activating enzyme (PPAE) ให้ทำหน้าที่เปลี่ยน proPO (inactive form) ให้เป็น PO (active form) เพื่อสร้างเมลานิน

จากการค้นหา และศึกษาหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบโพรฟีโนลออกซิเดสจากฐานข้อมูลจีโนมกิ้งกูดดำ คณะผู้วิจัยได้ค้นพบยีนที่มีความสำคัญในระบบนี้ ประกอบด้วยยีน *PmproPO1* และ *PmproPO2* (Amparyup และคณะ 2009) และ *PmPPAE1* (Charoensapsri และคณะ 2009) ซึ่งพบว่ามียีนเหล่านี้สำคัญต่อระบบโพรฟีโนลออกซิเดส และทราบหน้าที่ของยีน *PmClpSP1* (Amparyup และคณะ 2010) และ *PmMasSPH1* (Jitvaropas และคณะ 2009) ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของกิ้งกูด ถึงแม้ว่าการศึกษาก่อนหน้านี้ เราจะทราบหน้าที่ของยีนทั้งกลุ่ม proPO และ PPAE ในระบบโพรฟีโนลออกซิเดส อย่างไรก็ตามเนื่องจากระบบนี้มีการควบคุมอย่างซับซ้อน ดังนั้นการเข้าใจกลไกการทำงานของระบบนี้ในเชิงลึก จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาหน้าที่ของยีน PPAE ชนิดใหม่ในกิ้งกูด ชื่อว่า *PmPPAE2* และศึกษาหน้าที่ของยีน lipopolysaccharide and  $\beta$ -1,3-glucan binding protein (LGBP) ซึ่งเป็นยีนในกลุ่ม pattern recognition proteins (PRPs) ที่สำคัญในระบบ proPO โดยเมื่อมีเชื้อโรคเข้ามาบุกรุก โปรตีน PRPs จะทำหน้าที่จับจุลชีพที่บุกรุกเข้ามา และเกิดการกระตุ้นการทำงานของยีนกลุ่ม PPAE และส่งผลกระตุ้น phenoloxidase ให้สร้างเมลานินในการฆ่าจุลชีพ

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ (1) เพื่อค้นหาและวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบโพรฟีโนลออกซิเดสในกิ้งกูดดำ และ (2) ศึกษาหน้าที่ของยีนในระบบโพรฟีโนลออกซิเดสโดยใช้เทคนิค RNA interference โดยข้อมูลจากงานวิจัยนี้ จะทำให้ทราบหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบโพรฟีโนลออกซิเดส ที่มีต่อกลไกการสร้างภูมิคุ้มกันต้านต่อโรคของกิ้งกูดดำ เพื่อนำไปสู่การเพิ่มผลผลิตการเพาะเลี้ยงกิ้งกูด

## 1.2 วิจัยดำเนินการวิจัย

### ค้นหาฮีนที่เกี่ยวกับระบบโพรพีนอลออกซิเดส

ทำการออกแบบไพรเมอร์ จากฐานข้อมูลฮีนใน GenBank เพื่อค้นหาฮีน PPAE และ LGBP ที่เกี่ยวกับระบบโพรพีนอลออกซิเดส และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม Genetyx และแยกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของฮีน โดยใช้เทคนิค RACE-PCR

### ศึกษาหน้าที่ของฮีนที่เกี่ยวกับระบบโพรพีนอลออกซิเดสโดยใช้เทคนิค RNA interference

#### เตรียม double-stranded RNA (dsRNA) โดยใช้ *in vitro* transcription system

ทำการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการเตรียม dsRNA โดยในการทดลองนี้เราได้เลือกฮีน *PmPPAE2* และ *PmLGBP* มาศึกษาหน้าที่โดยใช้เทคนิค RNAi ขั้นตอนแรกทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะในแต่ละฮีน เพื่อนำมาสร้าง single-stranded RNA (ssRNA) ทั้ง sense RNA และ antisense RNA โดยไพรเมอร์แต่ละคู่จะมีไพรเมอร์สายหนึ่งที่ปลาย 5' มีส่วนของลำดับเบส T7 promotor ในการสร้าง dsRNA ของฮีน *PmPPAE2* และ *PmLGBP* จะใช้ไพรเมอร์ *PmPPAE2iT7-F* (5'GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGCGGGCAGCTCCTTGTTTC3') และ *PmPPAE2i-R* (5'AC TCTCGGGGCACGCTTGTTG3') หรือไพรเมอร์ *PmLGBPiT7-F* (5'GGATCCTAATAC GACTCACTATAGGAGGGCTCGTAGCGTCG GTC3' และ (*PmLGBP*i-R) 5'CGAAGGAACCTGTATTTG CT3' สร้างสาย (sense RNA และใช้ไพรเมอร์ *PmPPAE2i-F* (5' GCGGGCAGCTCCTTGTTG 3') และ *PmPPAE2iT7-R* (5' GGATCCTAATACGACTCACTATAGGACTCTCGGGGCACGCTTGTTG 3') หรือไพรเมอร์ *PmLGBP*i-F (5'AGGGCTTCGTAGCGTCGGTC3') และ *PmLGBP*iT7-R (5'GGATCCTAATACGACTCA CTATAGGCGAAGGAACCTGTATTTGCT3') สร้างสาย antisense RNA ตามลำดับ ในการทดลองครั้งนี้เราใช้ dsRNA GFP) green fluorescent protein) เป็นตัวควบคุม สร้างโดยใช้ไพรเมอร์ *GFPiT7-F* (5'TAATACGACTCACTATAGGATGGTGAGCAAGGGCGAGGA3') และ *GFPi-R* (5'TTACTTGTACAGCTCG TCCA3') สร้างสาย sense RNA และใช้ไพรเมอร์ *GFPi-F* (5'ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA3') และ *FPiT7-R* (5' TAATACGACTCACTATAGGTTACTTGTACAGCTCGT CCA 3') สร้างสาย antisense RNA นำไพรเมอร์มาเพิ่มปริมาณฮีนด้วย PCR แล้วแยกผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ด้วยแอกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้ววิเคราะห์คุณภาพและปริมาณ RNA ด้วย agarose gel electrophoresis และสเปกโทรโฟโตเมทรี

นำผลิตภัณฑ์ PCR ของฮีน *PmPPAE2* และ *PmLGBP* มาสร้างสาย sense RNA และ antisense RNA โดยใช้ T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production Systems (Promega) วิเคราะห์คุณภาพและปริมาณของ ssRNA ด้วย agarose gel electrophoresis และสเปกโทรโฟโตเมทรี นำมาทำให้เป็น dsRNA โดยบ่มที่อุณหภูมิ 70 °C แล้วให้สาย RNA จับกันเป็น dsRNA ที่อุณหภูมิประมาณ 25 °C วิเคราะห์คุณภาพและปริมาณด้วย agarose gel electrophoresis และสเปกโทรโฟโตเมทรี ก่อนที่จะนำมาฉีดเข้าสู่ตัวกุ้ง

### ฉีด dsRNA ในกึ่งกลาดำ

นำกึ่งกลาดำมาปรับสภาพในบ่อเลี้ยงที่มีความเค็ม 20 ppt เป็นเวลา 7 วันก่อนทำการทดลอง คัดเลือกกึ่งที่มีขนาดประมาณ 3 g และฉีด dsRNA เข้าตัวกึ่งประมาณ 5 µg ค่อน้ำหนักกึ่ง 1 g โดยใช้ เข็มขนาด 0.5 mL ฉีด dsRNA เข้าในข้อปล้องที่ 3 ของตัวกึ่ง ในกลุ่มควบคุม จะฉีดด้วย GFP dsRNA และ 150 mM NaCl เลี้ยงกึ่งเป็นเวลา 24 h แล้วทำการฉีด dsRNA ที่มี lipopolysaccharide (LPS) และ β-glucan ผสมอยู่ซ้ำ หลังจากนั้นเลี้ยงกึ่งอีกเป็นเวลา 48 h

### ตรวจวัดประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR

เก็บเลือดกึ่งในกลุ่มที่ฉีด dsRNA และกลุ่มควบคุมหลังจากเลี้ยงมาเป็นเวลา 48 h นำมาสกัด total RNA ด้วย TRI reagent และนำมาสร้าง first strand cDNA โดยใช้ ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega) และตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่ฉีดด้วย dsRNA และ buffer ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *PmPPAE2* และ *PmLGBP* และไพรเมอร์ของยีน EF1-α ซึ่งเป็นยีนควบคุม วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย agarose gel electrophoresis

### ตรวจสอบแอกทิวิตีของ phenoloxidase (PO) หลังการยับยั้งการแสดงออกของยีน

เพื่อศึกษาความสำคัญของยีน *PmPPAE2* และ *PmLGBP* ต่อระบบ proPO เก็บเลือดจากกึ่งที่มีการยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmPPAE2* หรือ *PmLGBP* ด้วยการฉีด dsRNA และกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย dsRNA ของยีน GFP มาตรวจสอบแอกทิวิตีของ PO โดยทำการวัดปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้วิธีของ Bradford และทำการตรวจแอกทิวิตีของ PO โดยเติมซับสเตรต L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) ลงในเลือดกึ่งที่มี total hemolymph protein 2 mg ทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 30 min หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 10% (v/v) กรดแอสซิดิก แล้วนำไปวัดค่า การดูดกลืนแสงที่ 490 nm

### การสร้างและผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ *PmLGBP*

โคลนยีน *PmLGBP* เข้าสู่ เวกเตอร์ pET28b บริเวณ *NcoI/NotI* จากนั้นทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* BL21-Codon Plus (DE3)-RIL จากนั้นเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ LB จนกระทั่งมีค่า OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.6 แล้วใส่ตัวกระตุ้น 1 mM IPTG เพื่อกระตุ้นการ แสดงออกของโปรตีน หลังจากนั้น 5 h ทำการเก็บเซลล์ โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วย lysis buffer (20mM Tris-HCl) แล้วทำการแตกเซลล์ด้วยเครื่อง ultrasonic oscillator จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกเศษเซลล์ทิ้ง เก็บส่วนสารละลายซึ่งมีโปรตีนอยู่ไปทำการ วิเคราะห์โดย SDS-PAGE

### ศึกษาการจับกัน ของ *PmLGBP* กับส่วนประกอบผนังเซลล์จุลินทรีย์ด้วยเทคนิค ELISA

นำ β-glucan จาก *Laminaria digitata* (Sigma L9634), LPS จาก *E. coli* O127:B8 (Sigma L3129), PGN จาก *Staphylococcus aureus* (InvivoGen) มาละลายให้ได้ความเข้มข้น 10 µg/µL ใส่

ลงใน 96-well microplate หลุมละ 2  $\mu\text{g}$  แล้วทำให้แห้ง โดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน จากนั้นบ่มที่ 60 °C เป็นเวลา 30 min แล้วเติม bovine serum albumin (BSA) บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 2 h ล้างเพลตด้วย TBS 4 ครั้ง ใส่โปรตีน *PmLGBP* 100 ng ลงในทุกหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 h ล้างเพลต ใส่ primary antibody (1:1000) บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 2 h ล้างเพลต เติม second antibody (goat-anti-rabbit IgG conjugated to alkaline phosphatase, 1:1500) บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 2 h ล้างเพลตด้วย TBS 4 ครั้งและ 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM diethanolamine 1 ครั้ง ใส่ *p*-nitrophenyl phosphate แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm โดยใช้เครื่อง microplate reader (Molecular Devices)

### ศึกษาหน้าที่ของโปรตีน *PmLGBP* ในการกระตุ้นระบบ proPO

เตรียมเม็ดเลือดกึ่งกลูตาโดยใช้เข็มดูดเลือดกึ่งใส่ในหลอดขนาด 1 mL ที่มีสารต้านการแข็งตัวของเลือด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 800g เป็นเวลา 10 min ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง เก็บส่วนล่างที่มี hemocyte ล้างด้วยบัฟเฟอร์ cacodylate (CAC) pH 7.0 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 800g เป็นเวลา 10 min ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง เก็บส่วนล่างที่มี hemocyte ใส่บัฟเฟอร์ CAC อีกครั้ง ทำให้เม็ดเลือดแตกโดยใช้ไมโครปิเปตต์ดูดขึ้นลงและวอร์เทกซ์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 25,000g, 25 min แล้วเก็บสารละลายส่วนบนที่มี hemocyte lysate supernatant (HLS) ใส่ในหลอดใหม่เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

ในการทดลองนี้ แบ่งเป็นสามกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม คือ ใส่โปรตีน *PmLGBP* แต่ไม่ใส่ตัวกระตุ้น กลุ่มที่ 2 ใส่ *PmLGBP* และตัวกระตุ้น  $\beta$ -glucan และกลุ่มที่ 3 ใส่ *PmLGBP* และตัวกระตุ้น LPS โดยขั้นแรกนำ HLS ที่เตรียมได้ มาวัดปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนโดยวิธีของ Bradford จากนั้นใส่ HLS 250  $\mu\text{g}$  และ *PmLGBP* 10  $\mu\text{g}$  ไปในทุกกลุ่ม ใส่  $\beta$ -glucan 50  $\mu\text{g}$  ในกลุ่มที่ 2 ใส่ LPS 50  $\mu\text{g}$  ในกลุ่มที่ 3 ทำการตรวจเอกทิวิตีของ PO โดยเติมซับสเตรต 65  $\mu\text{L}$ , 3 mg/mL ของ L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) ไปทุกกลุ่ม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 30 min หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 10% (v/v) กรดแอสซิติค แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 nm

## 1.3 ผลของการวิจัย

### การศึกษาลักษณะสมบัติของยีน *PmPPAE2* และ *PmLGBP*

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ศึกษาลักษณะสมบัติของยีน PPAE ชื่อว่า *PmPPAE2* ซึ่งเป็นยีนในกลุ่ม Clip domain serine proteinase และยีน *PmLGBP* ซึ่งเป็นยีนของ pattern recognition protein โดยได้หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน *PmPPAE2* พบว่ามีความเหมือนกับยีน PPAE1 ของแมลง *Manduca sexta* (50% similarity) และพบว่า mature protein มีกรดอะมิโน 346 ตัว และ signal

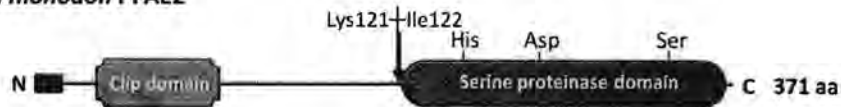
peptide จำนวน 25 ตัว โดย mature protein ประกอบด้วย clip domain ที่ปลาย N และ serine proteinase domain ที่ปลาย C (รูปที่ 1.1)

(A)

**MHYRVPTISCAAAVTLVLVLTSGGAT**RRDRRQARCSAGAPCVLVDSCPPVKALFLSPNAGDKHRAQQLICGREGRRLLKVCSSSNVTPTPRPIDVTPTSNPGGNGGQLLPSNCGQTSNLNKIFGGEATGVGEFPWMAVLGYNSGSLDWECGGALINDRYVLTAACHCGDPDFLFGSILTAIRLGEYDFSKSKDCNSAADFLPPVQDFTPEQVVLHPSFNKRAPESDDIALIRLNRRVQLNAGVHPICLPAAGLNVGSFLNGRDAIVIGWGHTERGTNTQVLQKVSLPFVDLGTCKRIHAGETLVNEQVCFGGRAGQDSCNGDSGGPLFLNAVPGTILGIVSKGGACGSPGVPAIYTDVASYRGWIVQNLKP

(B)

**Shrimp *P. monodon* PPAE2**



รูปที่ 1.1 ลักษณะสมบัติของยีน *PmPPAE2* (A) ลำดับกรดอะมิโนของ *PmPPAE2* บริเวณเพปไทด์สัญญาณพิมพ์ด้วยตัวหนาและขีดเส้นใต้ (B) โครงสร้างโดเมนที่พบใน *PmPPAE2* ของกุ้งกุลาดำ

ในส่วนของยีน *PmLGBP* พบว่ามี ORF ขนาด 1,101 bp เมื่อแปลรหัสจะได้โปรตีนที่มีกรดอะมิโน 366 หน่วย (รูปที่ 1.2 A) มีค่ามวลโมเลกุล 41.5 kDa มีเพปไทด์สัญญาณที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 17 หน่วย เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SMART พบว่า โปรตีน *PmLGBP* ประกอบด้วยส่วนสำคัญดังนี้ ส่วน glucanase-like domains ซึ่งมี integrin binding motif RGD อยู่สองบริเวณ (รูปที่ 1.2)

(A)

**MKGFVASVLLACGALA**AADIVEPEDCTSFPCMI FEDNFDYLDNDIWEHEITMSGGWNWFQAYVNNRSISYTRDSTLFIKPDLTSNWKGEDFLSSGTLDLWGMNGRGDVCTGNSYYGCSRVGSSNI INPVT SARLR TMSNFAFRYGRLEVR AKMPRGDWLWPAIWMLPRNWPYGLWPASGEIDILES RGNDDFGTLGNQYGGTTLHWGPFWPYNFFEKTHAEYSANTGSFADDFHVWRDLWTKDNMEFYVDDVLQLTVDPGTSFWDFAGMGPFFDNPWAAGAKMAPFDQK FYLILNVAVGGTNGFFPDGIASKPWSNLSPTAFLDFWNARDEWLP SWKAGEDRI SEGAAMQVDYVRVWKMESTEQ

(B)

**Shrimp *P. monodon* LGBP**

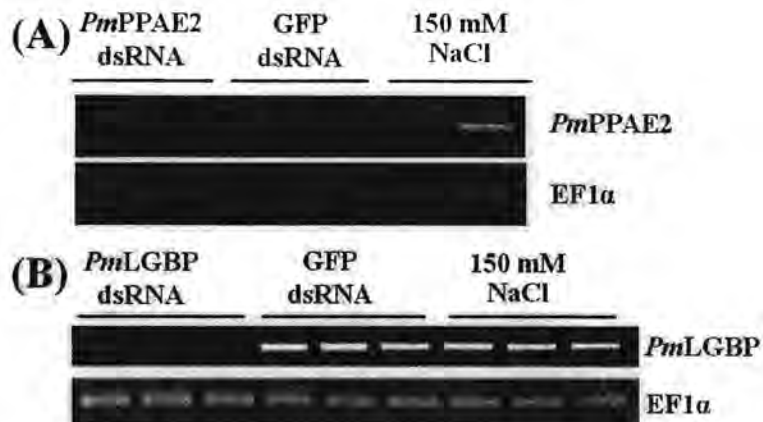


รูปที่ 1.2 ลักษณะสมบัติของยีน *PmLGBP* (A) ลำดับกรดอะมิโนของ *PmLGBP* บริเวณเพปไทด์สัญญาณพิมพ์ด้วยตัวหนาและขีดเส้นใต้ และบริเวณ integrin binding motif RGD 2 ตำแหน่งมีการเน้นด้วยอักษรตัวหนา (B) โครงสร้างโดเมนที่พบใน *PmLGBP* ของกุ้งกุลาดำ



### การศึกษาหน้าที่ของยีน *PmPPAE2* และ *PmLGBP* โดยใช้เทคนิค RNA interference

จากการยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmPPAE2* และ *PmLGBP* โดยฉีด dsRNA ของยีน *PmPPAE2* หรือ *PmLGBP* หรือ GFP (กลุ่มควบคุม) เข้าสู่ตัวกุ้ง และจากการตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า dsRNA ของ *PmPPAE2* หรือ *PmLGBP* สามารถลดการแสดงออกได้อย่างจำเพาะ (รูปที่ 1.3)



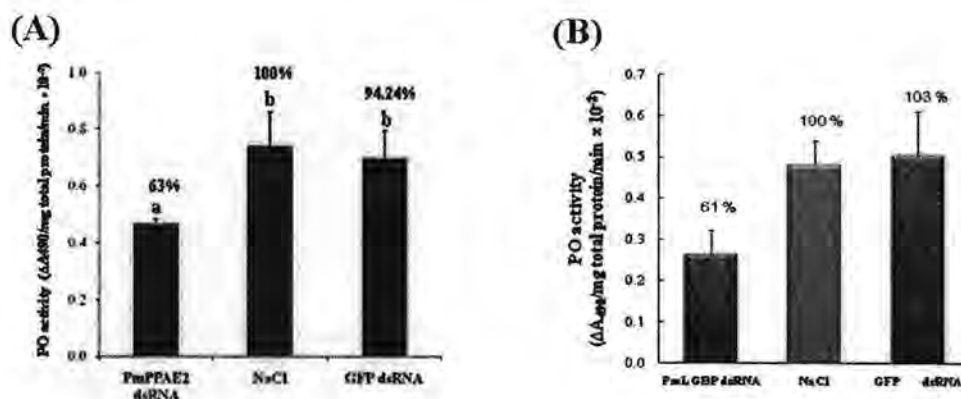
รูปที่ 1.3 การแสดงออกของยีน *PmPPAE2* (A) และ *PmLGBP* (B) ในเลือดของกุ้งกุลาดำที่ถูกฉีดด้วย *PmPPAE2* dsRNA หรือ *PmLGBP* dsRNA หรือ GFP dsRNA (กลุ่มควบคุม (หรือสารละลาย NaCl (กลุ่มควบคุม) (ฉีดกุ้งขนาดประมาณ 3 g ด้วยอัตราส่วน 5 µg dsRNA ต่อกุ้ง 1 g หลังจาก 24 h ฉีดซ้ำด้วย dsRNA ปริมาณเท่าเดิมพร้อมกับกระตุ้นด้วย LPS (50 µg) และ laminarin (50 µg) หลังจากนั้น 2 วัน (48 h ; A) และ 6 วัน (B) เก็บเลือดมาตรวจสอบด้วย RT-PCR โดยในแต่ละกลุ่ม ทำการทดลอง 3 ตัวอย่าง ใช้ยีน EF-1α เป็นยีนควบคุมภายใน

เมื่อตรวจสอบ PO activity ของกุ้งที่ถูก knockdown พบว่ากุ้งที่ฉีดด้วย dsRNA ของยีน *PmPPAE2* จะมี PO activity ลดลง 37% (รูปที่ 1.4A) ในขณะที่กุ้งที่ฉีดด้วย dsRNA ของยีน *PmLGBP* มี PO activity 39% (รูปที่ 1.4B) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (กุ้งที่ฉีดด้วย NaCl) ในขณะที่ PO activity ของกลุ่มที่ฉีดด้วย GFP dsRNA ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกุ้งที่ฉีดด้วย NaCl ( $p < 0.05$ , ANOVA, Duncan's test) สรุปได้ว่า ยีน *PmPPAE2* และ *PmLGBP* มีความเกี่ยวข้องกับระบบ proPO ในกุ้งกุลาดำ

### อัตราการตายของกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmPPAE2*

เพื่อทดสอบความสำคัญของยีนทั้งสองต่อความอยู่รอดของกุ้ง หลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *V. harveyi* 639 ซึ่งเป็น pathogenic bacteria ของกุ้งกุลาดำ ในการทดลอง ได้ฉีดกุ้งด้วยอัตราส่วน 2 µg dsRNA ต่อกุ้งหนัก 1 g โดยได้แบ่งกุ้งออกเป็นกลุ่ม กลุ่มละประมาณ 10 ตัวอย่าง และในแต่ละ

ละกลุ่มการทดลอง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง แบ่งเป็น 3 กลุ่ม กลุ่ม (1) กุ้งที่ฉีดด้วย *PmPPAE2* dsRNA กลุ่ม (2) กุ้งที่ฉีดด้วย GFP dsRNA (control dsRNA) และกลุ่ม (3) กุ้งที่ฉีดด้วย 150 mM NaCl (control)



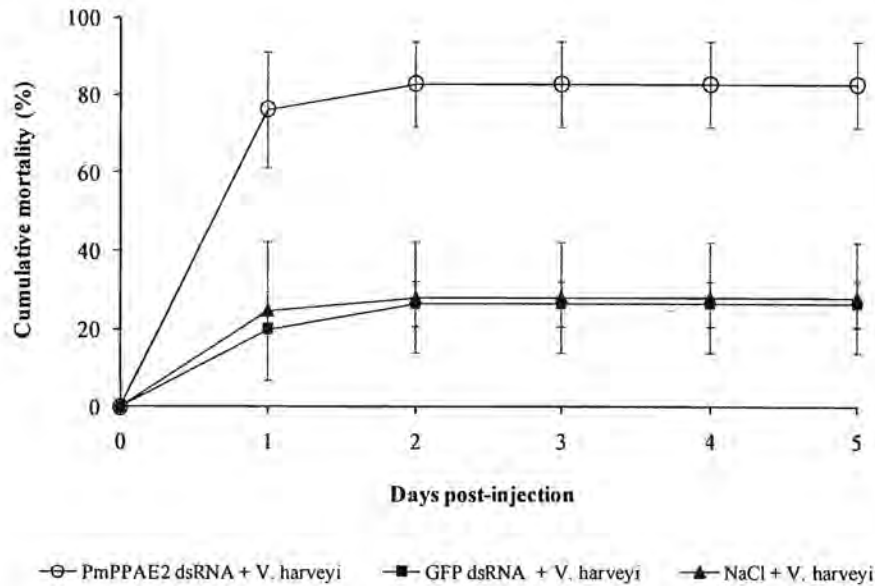
รูปที่ 1.4 แอกทิวิตีของ phenoloxidase ในเลือดของกุ้งกุลาดำที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmPPAE2* (A) และ *PmLGBP* (B) ด้วยเทคนิค RNAi ฉีดกุ้งขนาดประมาณ 3 g ด้วยอัตราส่วน 5  $\mu\text{g}$  dsRNA ต่อกุ้ง 1 g หลังจาก 24 h ฉีดซ้ำด้วย dsRNA ปริมาณเท่าเดิมพร้อมกับกระตุ้นด้วย LPS (50  $\mu\text{g}$ ) และ laminarin (50  $\mu\text{g}$ ) หลังจากนั้น 48 h เก็บเลือดมาตรวจสอบแอกทิวิตีของ PO ในการทดลอง ได้แบ่งกุ้งออกเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละตัวอย่าง และในแต่ละกลุ่มทดลอง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง กลุ่มที่ 1 (*PmPPAE2* dsRNA [A] หรือ *PmLGBP* [B]) กุ้งที่ฉีดด้วย *PmPPAE2* dsRNA [A] หรือ *PmLGBP* dsRNA [B] กลุ่มที่ 2 (GFP dsRNA) กุ้งที่ฉีดด้วย GFP dsRNA (control dsRNA) กลุ่มที่ 3 (NaCl) กุ้งที่ฉีดด้วย 150 mM NaCl (control)

ผลจากการทดลองพบว่า กุ้งกลุ่ม (1) ที่ฉีดด้วย *PmPPAE2* dsRNA มีอัตราการตายเพิ่มขึ้นเป็น 82.96% ภายใน 2 วันหลังการกระตุ้นด้วยเชื้อ (รูปที่ 1.5) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกุ้งกลุ่มควบคุม โดยกุ้งกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย GFP dsRNA (กลุ่ม 2) มีอัตราการตาย 26.67% และกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย 150 mM NaCl (กลุ่ม 3) มีอัตราการตาย 23.33% ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า ยีน *PmPPAE2* มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการต่อต้านเชื้อ *V. harveyi* ในกุ้งกุลาดำ

#### จำนวนของเชื้อ *V. harveyi* ในกุ้งกุลาดำที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RNAi

เมื่อตรวจสอบจำนวนเชื้อ *V. harveyi* ในกุ้งกุลาดำที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmPPAE2* หลังฉีดด้วยเชื้อ *V. harveyi* และดูเลือดมานับจำนวนเชื้อ *V. harveyi* โดย plate count method พบว่ากุ้งกลุ่มที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmPPAE2* มีจำนวนเชื้อมากขึ้นประมาณ 4 เท่า ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มกุ้งที่ฉีดด้วย GFP dsRNA (รูปที่ 1.6) ซึ่งมี

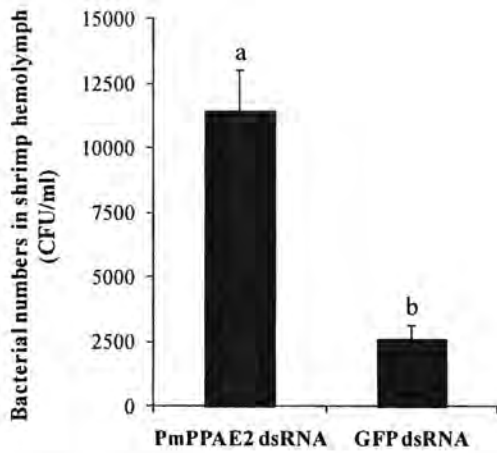
ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มกุ้งที่ฉีดด้วย GFP dsRNA จากผลการทดลองทั้งหมดสามารถวิเคราะห์ได้ว่า ยีน *PmPPAE2* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ proPO และเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญต่อการอยู่รอดของกุ้งที่ติดเชื้อ *V. harveyi* 639 ซึ่งเป็น pathogenic bacteria ในกุ้งกุลาดำ



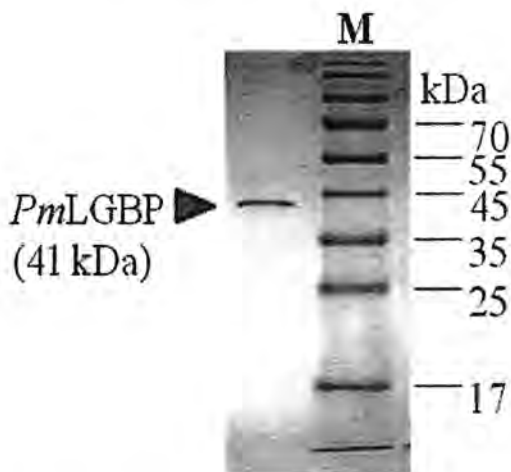
รูปที่ 1.5 อัตราการตายของกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนและกระตุ้นด้วยการฉีดเชื้อ *V. harveyi* 639 ( $2 \times 10^5$  CFU) โดยฉีดกุ้งขนาดประมาณ 10 g (อัตราส่วน 2  $\mu$ g dsRNA ต่อน้ำหนักกุ้ง 1 g) โดยแบ่งกุ้งเป็น 4 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัวอย่าง และทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง กลุ่ม 1 (O) กุ้งที่ฉีดด้วย *PmPPAE2* dsRNA กลุ่ม 2 (■) กุ้งที่ฉีด GFP dsRNA (control dsRNA) กลุ่ม 3 (▲) กุ้งที่ฉีดด้วย 150 mM NaCl (control)

### การสร้างและผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของยีน *PmLGBP*

เนื่องจากยีน *PmLGBP* เป็นยีนที่อยู่ในกลุ่มของ Pattern Recognition Protein (PRP) ที่ประกอบด้วยส่วนที่น่าจะมีความสำคัญทางชีวภาพ คือ glucanase-like domain ซึ่งคาดว่าสามารถใช้จับกับผนังเซลล์ของจุลชีพได้ เช่น  $\beta$ -glucan จากผนังเซลล์ของเชื้อรา ดังนั้น จึงได้ทำการสร้างและผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์เพื่อมาศึกษาหน้าที่ทางชีวภาพ ผลจากการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์พบว่า มีการแสดงออกอยู่ในส่วนที่เป็น inclusion body ทำให้ละลายโดยใช้ 8 M urea แยกให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Ni-NTA และนำไป refold ใน 20 mM Tris-HCl pH8.0 เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE พบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 40 kDa (รูปที่ 1.7) ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับ 40.8 kDa ที่คำนวณได้จากกรดอะมิโน แสดงให้เห็นว่า สามารถผลิตและแยกโปรตีนรีคอมบิแนนท์ให้บริสุทธิ์ได้ ซึ่งสามารถนำไปใช้ศึกษาหน้าที่ทางชีวภาพต่อไป



รูปที่ 1.6 จำนวนของเชื้อ *V. harveyi* 639 (CFU/ml) ในเลือดของกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmPPAE2* (*PmPPAE2* dsRNA) ฉีดกุ้งขนาดประมาณ 3 g (อัตราส่วน 2  $\mu$ g dsRNA ต่อ น้ำหนักกุ้ง 1 g) หลังจาก 24 h ฉีดซ้ำด้วย dsRNA ปริมาณเท่าเดิมพร้อมกับฉีดกระตุ้นด้วย *V. harveyi* 639 ( $2 \times 10^5$  CFU) จากนั้น 6 h เก็บเลือดมานับจำนวนเชื้อ *V. harveyi* โดย *plate count method* โดยแบ่งการทดลองเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 3 ตัวอย่าง และทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง กุ้งกลุ่มควบคุมฉีดด้วย GFP dsRNA (control dsRNA)



รูปที่ 1.7 การวิเคราะห์โปรตีนรีคอมบิแนนท์ *PmLGBP* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

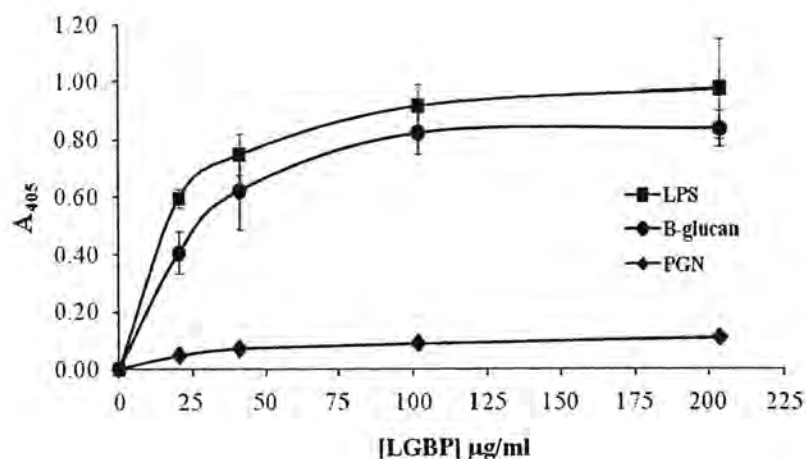
### การจับกันของโปรตีน *PmLGBP* กับผนังเซลล์จุลชีพ

เนื่องจากยีน *PmLGBP* เป็นยีนในกลุ่มของ PRP ซึ่งมีรายงานถึงหน้าที่จับกับผนังเซลล์ของจุลชีพได้ จึงได้ทำการศึกษาหน้าที่ทางชีวภาพของโปรตีนรีคอมบิแนนท์โดยการทำ binding assay จากการศึกษาการจับของโปรตีน *PmLGBP* กับส่วนประกอบของผนังเซลล์ คือ  $\beta$ -glucan, LPS และ PGN ตามลำดับ โดยใช้เทคนิค ELISA พบว่า โปรตีน *PmLGBP* สามารถจับกับ  $\beta$ -glucan และ LPS

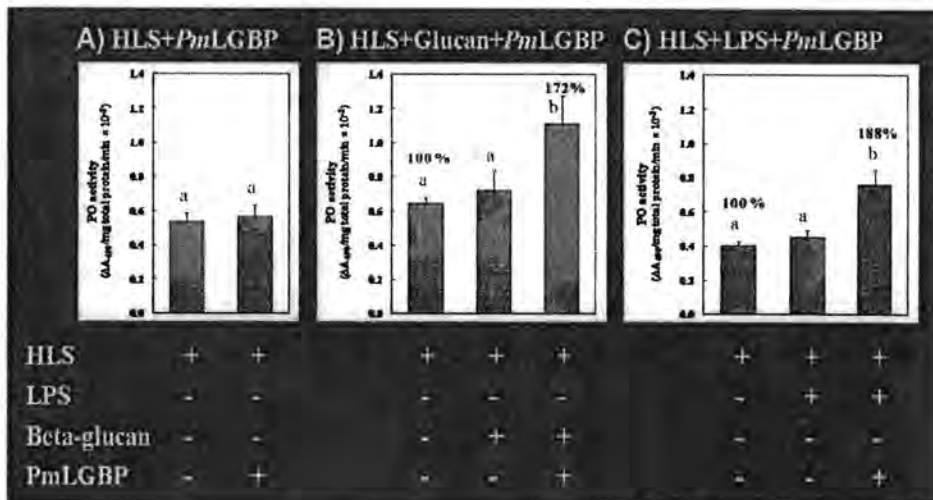
ได้ โดยการจับเพิ่มขึ้นตามปริมาณของโปรตีนที่มากขึ้น แต่ไม่จับกับ PGN แม้ว่าจะใช้ปริมาณของโปรตีน *PmLGBP* มากถึง 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (รูปที่ 1.8) สรุปได้ว่า โปรตีน *PmLGBP* มีความสามารถจับกับ  $\beta$ -glucan และ LPS ได้ดี แต่ไม่สามารถจับกับ PGN ได้

### การกระตุ้นระบบโพธิ์นอกลอกซิมิเคิลในเม็ดเลือดกึ่งกลาคำด้วยโปรตีน *PmLGBP*

จากการทดลองที่ผ่านมา พบว่า โปรตีน *PmLGBP* สามารถจับกับ glucan และ LPS ในการทดลองนี้ จึงต้องการทราบถึงความเกี่ยวข้องของ  $\beta$ -glucan และ LPS กับยีน *PmLGBP* และการกระตุ้นระบบ proPO โดยทดลองนำ glucan หรือ LPS มาบ่มกับโปรตีนในเม็ดเลือด (HLS) ของกึ่งกลาคำ และใส่โปรตีน *PmLGBP* แล้วเทียบผลกับกลุ่มที่ไม่ได้ใส่ตัวกระตุ้น แล้วดูแอกทิวิตีของ PO พบว่า กลุ่มที่ 1 (รูปที่ 1.9A) ซึ่งไม่เติมตัวกระตุ้น (HLS+*PmLGBP*) มีค่าแอกทิวิตีของ PO ในตัวอย่างที่ใส่เฉพาะ HLS เทียบกับตัวอย่างที่ใส่ทั้ง HLS และ *PmLGBP* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) แต่ในกลุ่มที่ 2 (รูปที่ 1.9B) เมื่อใส่  $\beta$ -glucan และโปรตีน *PmLGBP* ใน HLS พบว่ามี PO activity เพิ่มขึ้น 72% และในกลุ่มที่ 3 (รูปที่ 1.9C) เมื่อใส่ LPS และโปรตีน *PmLGBP* ใน HLS พบว่ามี PO activity เพิ่มขึ้น 88% เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใส่ตัวกระตุ้นและโปรตีน (รูปที่ 1.9 A) จากผลการทดลองสรุปได้ว่า  $\beta$ -glucan และ LPS ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อรา และแบคทีเรียแกรมลบ จะถูกจับด้วยโปรตีน *PmLGBP* แล้วส่งผลกระตุ้นการทำงานของระบบ proPO ให้เกิดขึ้น



รูปที่ 1.8 การจับกันของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ *PmLGBP* กับ  $\beta$ -glucan ( $\bullet$ ), LPS ( $\blacksquare$ ) และ PGN ( $\blacklozenge$ ) ตามลำดับ



รูปที่ 1.9 แอกทิวิตีของ phenoloxidase ในเม็ดเลือด (HLS) ของกุ้งกุลาดำที่บ่มกับ rPmLGBP ในการทดลองแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 3 ตัวอย่าง และในแต่ละกลุ่มทดลอง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง คือ กลุ่มที่ 1 (A) ไม่เติมตัวกระตุ้น (HLS+PmLGBP) กลุ่มที่ 2 (B) เติม  $\beta$ -glucan เป็นตัวกระตุ้น (HLS+ $\beta$ -glucan+PmLGBP) กลุ่มที่ 3 (C) เติม LPS เป็นตัวกระตุ้น (HLS+LPS+PmLGBP)

#### 1.4 วิจารณ์ผลของการวิจัย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ ได้ศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันโรคโดยระบบโปรฟีนอลออกซิเดส โดยงานวิจัยนี้ค้นพบยีน clip domain serine proteinase ชนิดใหม่ชื่อ *PmPPAE2* และยีน lipopolysaccharide และ  $\beta$ -1,3-glucan binding protein (*PmLGBP*) ซึ่งพบว่าเป็นยีนที่มีความสำคัญต่อระบบโปรฟีนอลออกซิเดส ซึ่งมีความสำคัญในการต่อต้านเชื้อก่อโรคในกุ้ง จากการศึกษาลักษณะสมบัติของยีน *PmPPAE2* ในกุ้งกุลาดำ ซึ่งพบว่ามีลักษณะเหมือนกับยีน *PPAE* ในแมลง เมื่อเปรียบเทียบกับยีน *PmPPAE1* ซึ่งเป็นยีนที่กลุ่มผู้วิจัยค้นพบก่อนหน้านี้ และมีความเกี่ยวข้องกับระบบ proPO ในกุ้ง (Charoensapsri และคณะ 2009) พบว่ามีความเหมือนกับกุ้ง crayfish มากกว่าในแมลง อย่างไรก็ตามลักษณะสมบัติของทั้งยีน *PmPPAE1* และ *PmPPAE2* ประกอบด้วย clip domain ที่ปลาย N และ serine proteinase domain ที่ปลาย C ในขณะที่การศึกษายีน *PmLGBP* พบว่ามีบริเวณ glucanase-like domain ซึ่งเป็นบริเวณที่สำคัญ ซึ่งคาดว่าสามารถจับกับผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ เช่น  $\beta$ -glucan จากผนังเซลล์ของเชื้อรา และมี integrin binding motif RGD อยู่สองบริเวณ ซึ่งคาดว่ามีส่วนที่สามารถจับกับ receptor บนผิวของเม็ดเลือดได้ เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโน จะมีความคล้ายกับ LGBP ของ crayfish *Pacifastacus leniusculus* ถึง 76% (Sritunyalucksana และคณะ 2002)

เมื่อศึกษาหน้าที่ของ *PmPPAE2* และ *PmLGBP* ถึงความเกี่ยวข้องกับระบบ proPO ด้วยเทคนิค RNAi พบว่า เมื่อยับยั้งการแสดงออกของยีนทั้งสอง พบว่าค่าแอกทิวิตีของ PO ลดลง 37-

39% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า ยีน *PmPPAE2* และ *PmLGBP* เป็นยีนที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับระบบ proPO ในกุ้ง เมื่อเปรียบเทียบผลการยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmPPAE1* ซึ่งมี PO activity ลดลง 37% (Charoensapsri และคณะ 2009) ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ การ silencing ของยีน *PmPPAE2* ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ทั้ง *PmPPAE1* และ *PmPPAE2* เป็นยีนที่อยู่ serine proteinase cascade ในระบบ proPO ของกุ้ง

การศึกษา ยีน PPAAE ในแมลง *Maduca sexta* พบ PPAAE ถึง 3 ชนิด (PAP1, PAP2 และ PAP3) ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน inactive proPO ให้เป็น active PO โดยทำงานร่วมกับ cofactor (*M. sexta* SPH-1 และ SPH-2) (Lee และคณะ 1998a,b และ Jiang และ Kanost, 2000) นอกจากนี้ การศึกษา ยีนในกลุ่ม clip domain serine proteinase เช่น ในแมลง *Holotrichia diomphalia* พบยีน clip domain serine proteinase 3 ยีน (PPAF-I, -II, and -III) (Kwon และคณะ 2000) และพบว่า กลไกในการกระตุ้น proPO (I และ II) ให้อยู่ในรูป active PO โดยการทำหน้าที่ของยีน PPAF-I ร่วมกับ PPAF-II (ทำหน้าที่เป็น cofactor) โดยในกระบวนการนี้ ยีน PPAF-III จะทำหน้าที่ตัด PPAF-II ให้อยู่ในรูป active form ซึ่งทำหน้าที่เป็น cofactor ของ PPAF-I (Lee และคณะ 1998a,b) ในสิ่งมีชีวิตกลุ่มครัสเตเชียนนั้น มีเพียงกุ้ง crayfish *Pacifastacus leniusculus* ชนิดเดียวที่มีการพบและศึกษาหน้าที่ของยีน PPAAE โดยพบว่า โปรตีนนี้สามารถกระตุ้น proPO ให้เป็น active PO ได้ (Cerenius และ Söderhäll, 2004; Liu และคณะ 2007)

นอกจากนี้เมื่อศึกษาความสำคัญของยีน *PmPPAE2* ต่อความอยู่รอดของกุ้งหลังจากที่กุ้งติดเชื้อ *V. harveyi* 639 พบว่า กุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกมีอัตราการตายเพิ่มสูงขึ้นเป็น 83% ภายในวันที่ 2 และพบว่ามีจำนวนเชื้อในเลือดมากขึ้นประมาณ 4 เท่า ผลจากการทดลองยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmPPAE2* ครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานครั้งก่อนที่ยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmPPAE1* ซึ่งเมื่อถูกยับยั้งการแสดงออกและตรวจสอบจำนวนเชื้อแบคทีเรียในเลือด พบว่า มีจำนวนเชื้อมากขึ้นประมาณ 4 เท่า (Charoensapsri และคณะ 2009) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ยีน *PmPPAE1* และ *PmPPAE2* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ proPO และระบบนี้เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญต่อการอยู่รอดของกุ้งที่ติดเชื้อ *V. harveyi* 639

นอกจากนี้ จากการศึกษาหน้าที่ทางชีวภาพของโปรตีน *PmLGBP* โดยการสร้างโปรตีนรีคอมบิแนนท์ พบว่า โปรตีน *PmLGBP* สามารถจับกับ  $\beta$ -glucan และ LPS ได้ แต่ไม่สามารถจับกับ PGN และพบว่า โปรตีนสามารถกระตุ้นระบบ proPO ได้เมื่อเกิดการจับกันของ *PmLGBP* กับ glucan หรือ LPS ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อราและแบคทีเรียแกรมลบ โดยจากรายงานการศึกษาใน crayfish พบว่า โปรตีน LGBP สามารถจับกับส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อราและแบคทีเรีย คือ  $\beta$ -glucan และ LPS ตามลำดับ แต่ไม่สามารถจับกับ PGN ได้ (Lee และคณะ 2000) การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า ยีน *PmLGBP* เป็นยีนสำคัญ ที่มีหน้าที่การทำงานเกี่ยวข้องกับระบบ proPO ของกุ้งกุลาดำ และถูกกระตุ้นให้ทำงานโดยการจับกับ glucan และ LPS

แต่ไม่สามารถกระตุ้นด้วย PGN ผลจากการศึกษาคั้งนี้สรุปได้ว่า เราทราบหน้าที่ของยีน *PmPPAE2* เป็นยีน clip-domain serine proteinase และ *PmLGBP* เป็นยีน pattern recognition protein ที่ทำหน้าที่จับผนังเซลล์จุลชีพ ว่าเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ proPO ในกุ้ง

### 1.5 สรุปผลของการวิจัย

ในการศึกษาคั้งนี้ ได้ค้นหาและศึกษาลักษณะสมบัติของยีน *PPAE* และยีน *LGBP* จากการศึกษาหน้าที่ของยีนต่อความเกี่ยวข้องกับระบบโพรฟีนอลออกซิเดส พบว่า กุ้งที่ฉีดด้วย dsRNA ของยีน *PmPPAE2* และ *PmLGBP* มี PO activity ลดลง อย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อศึกษาความสำคัญ ของยีน *PmPPAE2* ต่อความอยู่รอดของกุ้งหลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *V. harveyi* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในกุ้ง พบว่ากุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmPPAE2* ทำให้กุ้งมีอัตราการตายเพิ่มสูงขึ้น และมีจำนวนเชื้อมากขึ้น นอกจากนั้นจากการศึกษาหน้าที่ทางชีวภาพของโปรตีน *PmLGBP* พบว่าโปรตีนสามารถจับกับ  $\beta$ -glucan และ LPS ได้ แต่ไม่สามารถจับกับ PGN และพบว่าสามารถกระตุ้นระบบโพรฟีนอลออกซิเดสได้ ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ยีน *PmPPAE2* และ *PmLGBP* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบโพรฟีนอลออกซิเดส และระบบนี้เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญต่อการอยู่รอดของกุ้งที่ติดเชื้อ *V. harveyi*

โดยองค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้ รวมถึงองค์ความรู้ของยีนในระบบโพรฟีนอลออกซิเดสที่ได้จากงานวิจัยของผู้วิจัยที่ผ่านมา ประกอบด้วยยีน *PmproPO1*, *PmproPO2* และ *PmPPAE1* จะมีประโยชน์อย่างมากต่อการเข้าใจกลไกของระบบโพรฟีนอลออกซิเดส ในกุ้งกุลาดำ ซึ่งจะนำไปสู่การเพาะเลี้ยงกุ้งต้านโรคได้ต่อไป



## โครงการย่อยที่ 2: การค้นหายีนกุ้งกุลาดำที่ตอบสนองต่อสถานะติดเชื้อด้วย cDNA microarray

### 2.1 คำนำ

ปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งประสบปัญหาโรคระบาดจากเชื้อก่อโรคต่างๆในกุ้ง โดยเฉพาะจากเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย เชื้อไวรัสที่ก่อโรคที่สำคัญในกุ้งได้แก่ WSSV (ตัวแดงดวงขาว), YHV (หัวเหลือง), TSV (ทอรา) และ HPV (Flegel และคณะ 2004; Flegel, 2006; Flegel, 2007) การติดเชื้อมีผลต่อโรคของกุ้งก่อให้เกิดการสูญเสียในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งอย่างมาก การศึกษาวิจัยหาวิธีป้องกันการติดเชื้อของกุ้ง จึงเป็นงานวิจัยที่ช่วยลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจของประเทศไทย แนวทางการป้องกันการเกิดโรคถือเป็นยุทธศาสตร์ที่สำคัญในการพัฒนาอุตสาหกรรมเลี้ยงกุ้งของไทย

การเข้าใจการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในการป้องกันการก่อโรคของเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย จะเป็นส่วนหนึ่งที่จะช่วยให้สามารถควบคุมการระบาดของโรคในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งได้ รายงานที่ผ่านมาได้แสดงลักษณะและศึกษาหน้าที่ของยีนต่างๆในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง รวมถึงการตอบสนองของยีนที่มีต่อการติดเชื้อ มีการแสดงลักษณะและศึกษาหน้าที่ของยีนในกลุ่ม pattern recognition proteins (Sun และคณะ 2008a, b; Zhao และคณะ 2009), antimicrobial peptides (Tassanakajon และคณะ 2010), phenoloxidase (PO) system (Amparyup และคณะ 2009; Ai และคณะ 2009), proteinase inhibitors (Somprasong และคณะ 2006; Wang และคณะ 2009; Rimphanitchayakit และ Tassanakajon, 2010) และยีนกลุ่ม apoptosis (Phongdara และคณะ 2006; Leu และคณะ 2008) เป็นต้น สำหรับการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนเมื่อกุ้งติดเชื้อก่อโรค จะช่วยให้เข้าใจระบบภูมิคุ้มกันเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน การศึกษานี้จะช่วยบ่งชี้ยีนที่น่าจะทำหน้าที่ต่อต้านการติดเชื้อในกุ้ง ซึ่งเทคนิค DNA microarray เป็นเทคนิคที่สามารถวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของยีนในเวลาเดียวกันเป็นจำนวนมาก ซึ่งให้ข้อมูลการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่างๆที่มีต่อสิ่งกระตุ้น ได้มีการใช้เทคนิค DNA microarray เพื่อวัดระดับการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงในสัตว์น้ำเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น ปลาแซลมอน (Jørgensen และคณะ 2008), ปลาคูก (Peatman และคณะ 2008), กุ้งจีน (*Fenneropenaeus chinensis*) (Wang และคณะ 2008) และ วัช (Glass และคณะ 2007) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนในกุ้งด้วย DNA microarray จำกัดที่ยีนจำนวนไม่มากนัก คือไม่เกิน 3,500 ยีน (Dhar และคณะ 2003; Wongpanya และคณะ 2007; Pongsomboon และคณะ 2008; Wang และคณะ 2008)

ในการศึกษานี้ได้ใช้เทคนิค cDNA microarray เพื่อค้นหายีนที่มีการแสดงออกตอบสนองต่อเชื้อก่อโรคในกุ้งคือ ไวรัส WSSV, ไวรัส YHV และ แบคทีเรีย *Vibrio* โดย cDNA microarray chip ที่ใช้ศึกษาประกอบด้วยยีนของกุ้งกุลาดำที่แตกต่างกันจำนวน 9,990 ยีน ที่รวบรวมได้จากยีนในฐานข้อมูล EST ของกุ้งกุลาดำ (<http://pmonodon.biotec.or.th>) การศึกษานี้จะเพิ่มข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง

## 2.2 วิธีดำเนินการวิจัย

### ตัวอย่างทดลอง

แบ่งกึ่งกลาดำระยะ 3-4 เดือน ที่มีสุขภาพดี น้ำหนักตัวประมาณ 20 กรัม เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม กลุ่มทดลองเป็นกึ่งที่ถูกฉีดด้วยเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรีย กลุ่มควบคุมเป็นกึ่งที่ถูกฉีดด้วยสารละลายที่ใช้เจือจางเชื้อ ทำการเก็บเม็ดเลือดของกึ่งกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม หลังจากฉีดเชื้อเป็นเวลา 6, 24 และ 48 h สกัด total RNA จากเม็ดเลือดกึ่งด้วย TRI REAGENTS (Molecular Research Center, USA) และกำจัด DNA ด้วย DNase I (Promega, USA)

### การไฮบริดซ์ cDNA microarray slide และการวิเคราะห์ expression profile

สร้างสาย cDNA จาก total RNA 10 µg ทำการติดฉลาก cDNA แบบ indirect labeling ของ amino-allyl-dUTP ด้วย dye Cy3 หรือ Cy5 โดยใช้ Labelstar Array kit (QIAGEN) สำหรับไฮบริด เซชัน นำ cDNA ของกึ่งกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมที่ติดฉลากด้วย dye ต่างชนิดกัน มาผสมกับ 25% 20× SSC, 8% 50× Denhardt's solution และ 0.5% SDS และหยดลงบนสไลด์ microarray ที่ประกอบด้วยยีนของกึ่งกลาดำที่แตกต่างจำนวน 9,990 ยีน ทำการไฮบริดซ์ที่ 42 °C นาน 16 h จากนั้น ทำการล้างสไลด์ microarray อ่านผลสไลด์ที่ผ่านการไฮบริดซ์ด้วย scanner และวิเคราะห์ข้อมูลด้วย GenePix Pro (Amersham Biosciences) และ MIDAS (<http://www.tigr.org/software>) ยีนที่มีค่า ratio ของ median ของ fluorescent signal ของกึ่งกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมเปลี่ยนแปลง ตั้งแต่ 2 เท่าขึ้นไป ถือว่าเป็นยีนที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออก

### ยืนยันผลที่ได้จากการทำ microarray ด้วย real time RT-PCR

สร้างสาย cDNA จาก total RNA 1 µg โดยใช้ Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) วัดระดับการแสดงออกของยีนด้วย iCycler iQTM Real-Time Detection system โดยใช้ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, USA) สภาวะที่ใช้ในการวัดระดับการแสดงออก คือ 95 °C 8 min, 40 รอบที่ 95 °C 20 sec, อุณหภูมิที่เหมาะสม annealing 25 sec, และ 72 °C 30 sec ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ และ อุณหภูมิของ annealing แสดงในตารางที่ 1 ค่าการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนคำนวณโดยใช้  $2^{-\Delta\Delta CT}$  และ  $\beta$ -actin เป็นยีนควบคุม เปรียบเทียบระดับการแสดงออกระหว่างกึ่งกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 1. รายละเอียดของไพรเมอร์ และ อุณหภูมิที่ใช้ annealing

Highest homology <sup>2</sup>	GenBank accession	Primer sequence 5' - 3'	Annealing (°C)
AGAP000432-PA	DW042937	F CGTCCTTCAGTGCCTTCCATA R ACAGCGACTCCAAGGTCTACGA	60
Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	GW996584	F GGCAGTCTTAGGCATGACAG R CTTGTAGTTGCGCCTCTCAG	50
Cathepsin L	ES609112	F ATCAGGGCTACGTAAAGATGG R CAAGGTCTAGTGCTCAGAAT	65
Unknown	HO004745	F CACTCTGATCGCCAGTGA R CATAACGCCTTCGTTGTC	50
Penaeidin 5	GH717907	F AGTGGCTGGACGACTGATT R GGCGGTTACACAGGTTTCAT	55
Hemocyte kazal-type proteinase inhibitor (Pm2)	BI018075	F ATGCAACCACGTCTGTACTG R CTGCAAGGTTCCACATCT	55
β-actin	HO113015	F GAACCTCTCGTTGCCGATGGTG R GAAGCTGTGCTACGTGGCTCTG	60

<sup>2</sup>มีความเหมือนกับ โปรตีนหรือยีนใน Genbank จากการเปรียบเทียบด้วย BlastX หรือ BlastN ที่ค่าน้อยกว่า E<sup>-4</sup>

### 2.3 ผลของการวิจัย

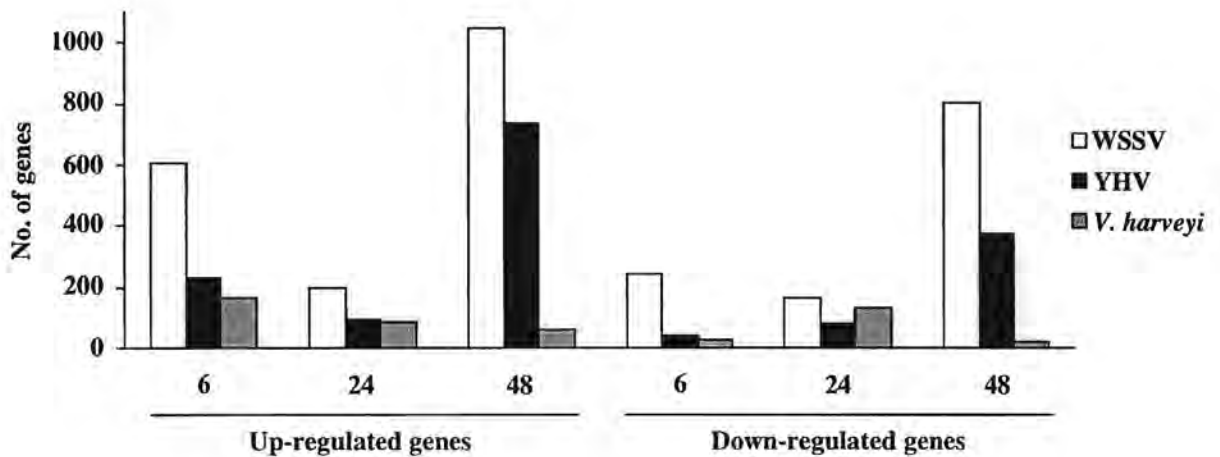
#### รูปแบบการแสดงออกของยีนในกิ้งกัดเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย

จากการใช้เทคนิค cDNA microarray เพื่อค้นหายีนที่มีการแสดงออกตอบสนองต่อเชื้อก่อโรคในกิ้งกัด คือ เชื้อไวรัส WSSV, YHV และแบคทีเรีย *V. harveyi* โดย cDNA microarray chip ที่ประกอบด้วยยีนของกิ้งกูดาค่าที่แตกต่างกันจำนวน 9,990 ยีน ซึ่งรวบรวมจากยีนในฐานข้อมูล EST ของกิ้งกูดาค่า (<http://pmonodon.biotech.or.th>) ศึกษาการแสดงออกของยีนในเมื่อดูดกิ้งกัดที่เวลา 6, 24 และ 48 h หลังการฉีดเชื้อ ยีนที่มีระดับการแสดงออกเปลี่ยนแปลงคือ ยีนที่มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นหรือลดลงตั้งแต่ 2 เท่าขึ้นไป เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มฉีดเชื้อและกลุ่มควบคุม

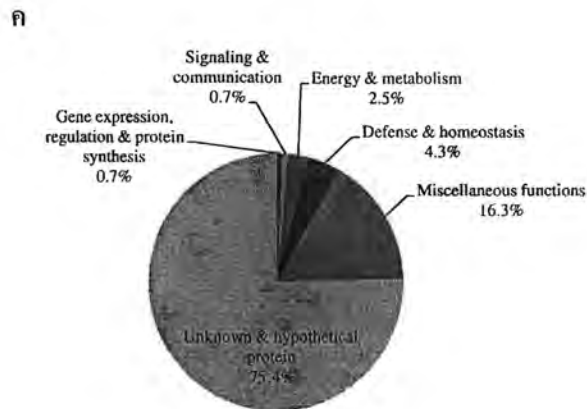
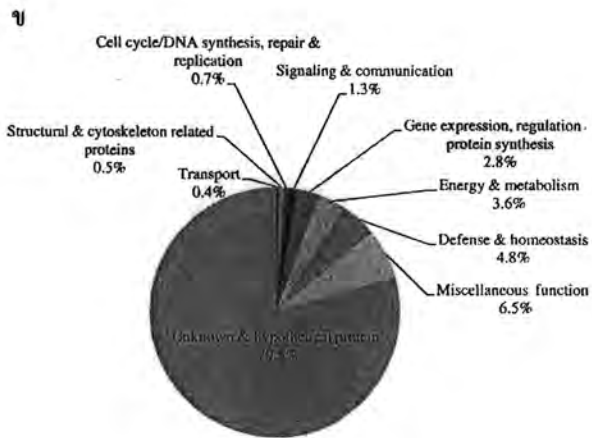
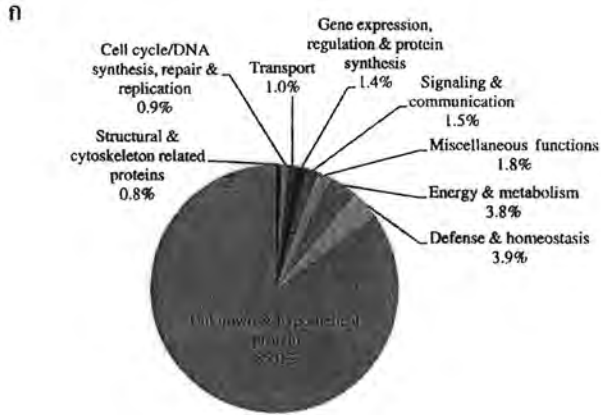
จำนวนยีนที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัส WSSV, YHV และแบคทีเรีย *V. harveyi* มีจำนวน 1954, 1136 และ 420 ยีน ตามลำดับ ซึ่งจำนวนยีนที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อแบคทีเรียน้อยที่สุด ยีนที่แสดงออกเปลี่ยนแปลงไปทั้งเพิ่มขึ้นและลดลงในไวรัส พบสูงที่ 48 h หลังการฉีดเชื้อ สำหรับการติดเชื้อแบคทีเรีย ยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นพบสูงที่ 6 h และยีนที่มีการแสดงออกลดลงพบสูงที่ 24 h (รูปที่ 2.1) กิ้งกัดที่ฉีดด้วยเชื้อไวรัสมีอัตราการตายสูงสุดที่ 48 h ลักษณะของกิ้งกัดที่ติดเชื้อที่ 48 h จะไม่กินอาหารและไม่เคลื่อนไหว สำหรับกิ้งกัดที่ฉีดด้วยเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* จะพบกิ้งกัดตายหลังจาก 6 ถึง 24 h หลังจากฉีดเชื้อ ยีนที่แสดงออกลดลงทั้งในกิ้งกัดด้วยเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรียพบสูงสุดในสภาวะที่กิ้งกัดมีการติดเชื้อสูงสุด สำหรับยีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นในไวรัสพบสูงสุดใน

สภาวะที่กุ้งมีการติดเชื้อสูงสุดเช่นกัน แต่ในกุ้งติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* พบสูงสุดในสภาวะที่กุ้งเริ่มติดเชื้อ

ได้จัดแบ่งกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นตามหน้าที่ของยีน คือ 1) defense & homeostasis 2) gene expression, regulation & protein synthesis 3) signaling & communication 4) energy & metabolism 5) cell cycle/DNA synthesis, repair & replication 6) transport 7) structural & cytoskeleton related protein 8) miscellaneous และ 9) hypothetical & unknown ยีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นเป็นยีนที่ทราบหน้าที่ (known gene) คิดเป็นสัดส่วน 15-25% (รูปที่ 2.2) รายละเอียดของยีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นในแต่ละเชื้อก่อโรคแสดงดังตารางที่ 2



รูปที่ 2.1 จำนวนยีนที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัส WSSV, ไวรัส YHV และแบคทีเรีย *V. harveyi* ในแต่ละเวลาที่ทำการทดสอบ



รูปที่ 2.2 การกระจายตัวของยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นตามหน้าที่ (ก) ไวรัส WSSV (ข) ไวรัส YHV และ (ค) แบคทีเรีย *V. harveyi*

ตารางที่ 2. ยีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นในกุ้งติดเชื้อไวรัส WSSV, YHV และแบคทีเรีย *Vibrio*

Putative gene <sup>a</sup>	Accession	Pathogen <sup>b</sup>	Putative gene <sup>a</sup>	Accession	Pathogen <sup>b</sup>
<b>Defense &amp; homeostasis</b>			<b>metallothionein family protein</b>		
<i>Antimicrobial peptide</i>				GW996531	Y
anti-lipopolysaccharide factor	GW996558	W Y V	<i>Clotting protein</i>		
anti-lipopolysaccharide factor like protein	HO000126	Y	coagulation factor VIII-associated protein	GW996609	Y
crustin <i>Pm4</i>	GW996591	W Y	transglutaminase	GW996627	W Y
crustin <i>Pm4</i>	GW996598	W Y	<i>Others</i>		
penaeidin 3	GW996597	W Y V	chitinase precursor	GW996663	W Y
penaeidin 5	GH717907	W Y	gamma-interferon-inducible-lysosomal thiol reductase	GW996670	W Y
penaeidin 3b	GW996568	W Y V	hemomucin	EE662888	W Y
penaeidin 3b	BI018080	W Y V	laccase 1	GW996564	W Y V
single whey acidic protein domain-containing protein isoform 2	GW996553	W	thrombospondin	GE615735	W Y
			thymosin beta isoform 2	GW996672	W Y
<i>Pattern recognition protein</i>			<b>Cell cycle/DNA synthesis, repair &amp; replication</b>		
chitin-binding lectin	GW996655	W Y V	<i>Apoptosis &amp; their inhibitors</i>		
C-type lectin receptor	EE663427	W Y	baculoviral IAP repeat-containing protein 4	GW996673	W
ficolin 1-like	GW996661	W Y	rbm25 protein	GW996509	W
minus agglutinin	GW996503	W Y	<i>Cell differentiation</i>		
PMAV	GW996665	W V	GRN protein	GW996620	W Y
vesicular mannose-binding lectin	GW996525	W	protein VPRBP	GW996618	W Y
<i>Proteinase &amp; their inhibitors</i>			tankyrase, TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase, isoform CRA_a	CO408912	W Y
cathepsin L	ES609112	W Y	tumor suppressor pHyde	GW996650	W
hemocyte kazal-type proteinase inhibitor ( <i>Pm2</i> )	GW996550	W Y	<i>Others</i>		
hemocyte kazal-type proteinase inhibitor ( <i>Pm5</i> )	DW677813	W Y	DNA double-strand break repair Rad50 ATPase	DW042682	W Y
papain family cysteine protease containing protein	GW996573	W Y	structural maintenance of chromosomes 1A	DW042711	W
protease inhibitor	GW996574	W Y	structural maintenance of chromosomes smc2	GW996594	W Y
protease m1 zinc metalloprotease	HO000124	W V	<b>Signaling &amp; communication</b>		
serine proteinase inhibitor	GW996560	W Y	<i>Protein kinase</i>		
tick legumain	GW996656	W Y	cdk10/11	EE663371	W Y V
<i>Prophenol oxidase system</i>			<i>G protein signal cascade</i>		
alpha-2-macroglobulin	GW996551	W Y	adenylate cyclase	GW996671	W
masquerade-like serine proteinase-like protein 2	GW996570	W Y V	arfaptin-2	HO000141	W Y
prophenoloxidase-activating enzyme	GW996626	W Y V	brain adenylyl cyclase 8	GW996527	W
prophenoloxidase-activating enzyme 2	GW996495	W Y	camp and camp-inhibited cgmp 3,5-cyclic phosphodiesterase	HO000129	W Y
prophenoloxidase activating factor	GW996586	W Y	cyclic AMP-regulated protein like protein	GW996601	W Y
<i>Chaperone</i>			G protein-coupled receptor 112	HO000139	W Y
dnaK protein	GW996545	W	ran gtpase-activating protein	HO000125	Y
heat shock protein70 kD	GW996541	W Y	<i>Calcium related genes</i>		
heat shock protein 70 kD	GW996589	W Y	calmodulin	GW996610	W Y
heat shock protein 90 kD	GW996577	W Y			
<i>Detoxification</i>					
copper/zinc superoxide dismutase	GW996530	W Y			
glutathione S-transferase mu	GW996506	W Y V			

ตารางที่ 2. (ต่อ)

Putative gene <sup>a</sup>	Accession	Pathogen <sup>b</sup>
calpain B	GW996547	W Y
EF hand family protein	GW996538	W
<i>Others</i>		
ankyrin repeat domain protein	GW996596	W Y
Dolichyldiphosphatase fasciculation and elongation protein zeta	GW996669 GW996521	W Y W
Paxillin	GW996561	W Y
signal recognition particle 54 kDa protein	GW996556	W V
signal sequence receptor beta	GW996563	W
serine/threonine-protein phosphatase PP-V	GW996666	W
<b>Gene expression, regulation &amp; protein synthesis</b>		
<i>Transcription</i>		
CCR4-NOT transcription complex, subunit 10	GW996492	W
CD151 antigen	GW996502	W Y
enhancer of yellow 2 transcription factor	GW996628	Y
Ets protein	HO000130	W Y
novel KRAB box and zinc finger, C2H2 type domain containing protein	GW996602	Y
transcription elongation regulator 1 (ca150)	GW996490	Y
transcription factor	HO000127	W Y V
transcription initiation factor IIF subunit beta isoform I	GW996559	Y
RNA polymerase II elongation factor ELL2	GW996562	W Y
<i>Translation</i>		
eukaryotic translation initiation factor 2 gamma subunit	GW996615	W Y
<i>RNA processing</i>		
23S rRNA 5-methyluridine methyltransferase	CK991463	W
ATP-dependent RNA helicase	HO000128	W Y
ATP-dependent RNA helicase DDX54	CO777310	W Y
DNA dependent ATPase and helicase	GW996488	W V
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein r	GW996489	W Y
pre-mRNA splicing factor	HO000121	W Y
ribosome biogenesis protein NSA2	GW996639	W Y
splicing factor, arginine/serine-rich 11	GW996636	W Y
<b>Energy &amp; metabolism</b>		
<i>Nucleic acid metabolism</i>		
adenosine deaminase	GW996621	W Y
<i>Protein metabolism</i>		
26S protease regulatory subunit 8	GW996635	Y
chymotrypsin B1	GW996664	Y
cystathionine beta-lyase	GW996543	W V
dmgdh protein	GW996653	W Y

Putative gene <sup>a</sup>	Accession	Pathogen <sup>b</sup>
hypothetical protein OsI_023128 (polyubiquitin 2)	EE662983	W Y V
L-kynurenine/alpha-aminoadipate aminotransferase	GW996501	W Y
L-kynurenine hydrolase	GW996508	W Y
proteasome alpha 4 subunit	GW996607	W Y
proteasome-associated protein ECM29	GW996542	W
proteasome/cyclosome repeat family protein	GW996536	W Y
proteasome delta	GW996571	W
small ubiquitin-like modifier 1	GW996576	W Y
trypsin	GW996658	Y
ubiquitin-conjugating enzyme E2-230k	CO576855	Y
ubiquitin-conjugating enzyme H5b	GW996493	W
<i>Glucose &amp; carbohydrate metabolism</i>		
beta-1,4-mannanase	GW996651	W Y
fructose 1,6-bisphosphate aldolase	GW996515	W
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase LRcO_3	GW996516	W
oligosaccharyl transferase	CK991473	W Y
phosphoglucose isomerase	GW996557	W
phosphopyruvate hydratase	GW996634	W
short-chain alcohol dehydrogenase	GW996617	Y
stylicine 2	EE662595	W V
triosephosphate isomerase	GW996588	W Y
	GW996643	W
<i>Fatty acid metabolism</i>		
phytanoyl-CoA dioxygenase	GW996496	Y
<i>Electron transport</i>		
arginase, type 2	DW042869	W Y V
coenzyme Q5 homolog, methyltransferase	GW996497	W
cytochrome c oxidase	CK991535	W
cytochrome c oxidase subunit II	GW996555	W Y
cytochrome c oxidase subunit VIc	HO000119	W Y
cytochrome c oxidase, subunit VIIA	GW996504	W Y
NADH dehydrogenase isoform 1	EB409358	W
NADH-ubiquinone oxidoreductase Fe-S protein 7	GW996585	W
succinate dehydrogenase, cytochrome b subunit	GW996579	W Y
<i>ATP synthesis</i>		
ATP lipid-binding protein like protein	DW042557	W Y
ATP synthase a chain	DW404925	W
ATP synthase subunit gamma	GW996590	W V
<i>Others</i>		
acyl-CoA-binding protein charged multivesicular body protein 2a	GW996583	Y V
	HO000131	W Y
Dyak\GE21870-PA	EB409247	W Y

ตารางที่ 2. (ต่อ)

Putative gene <sup>a</sup>	Accession	Pathogen <sup>b</sup>	Putative gene <sup>a</sup>	Accession	Pathogen <sup>b</sup>
methylnalonate-semialdehyde dehydrogenase family protein	GW996540	W	cuticle protein	EE663326	W Y V
mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	GW996584	W Y V	cytochrome P450 enzyme	GW996500	W
<b>Transport</b>			DNA binding protein with his-thr domain	GW996533	V
<i>Cation transport</i>			DUF788 membrane protein	GW996554	Y V
high-affinity potassium transporter	GW996513	W Y	glycolipid transfer protein domain containing 1	HO000135	Y
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase alpha subunit	GW996498	W	GPI-anchored cell surface glycoprotein (flocculin)	GW996581	Y V
prolyl-tRNA synthetase	EE661921	W	histone h1.1	GW996633	W
V-type ATPase subunit D	GW996641	W	integral membrane regulatory protein	GW996599	Y V
<i>Protein transport</i>			kelch domain-containing protein	GW996548	W V
AP-3 complex subunit beta-1	GW996569	W Y	lamin CG6944-PA	HO000133	Y V
clathrin coat assembly protein ap17	GW996604	Y	lim domain binding protein	EE662826	Y V
sodium-dependent nutrient amino acid transporter	GW996512	W	male-specific lethal 3-like 1	GW996523	Y
<i>Others</i>			mammalian NucleoSTemin membrane-associated	EB409271	Y
metal ion transporter	GW996578	W Y	DHHC5 zinc finger protein	EB389185	Y V
mf5 transporter	GW996494	W	mitochondrial ribosomal protein, L40	GW996605	W Y
solute carrier family 6, member9	GW996505	W	niemann-Pick Type C-2	GW996629	W Y V
<b>Structural &amp; cytoskeleton related proteins</b>			nuclear respiratory factor-2 subunit alpha	GW996587	Y V
Actin	GW996592	W	nucleic acid binding	GW996532	Y V
actin-binding protein ipp	HO000134	W Y	p15-2a protein	GW996575	Y V
alpha-tubulin	GW996580	W	PDZ domain-containing protein	GW996514	W V
dynein heavy chain	DW678139	W	phd finger protein	EB389144	V
keratin associated protein 4-11 isoform 3	GW996657	W Y	plasminogen activator sPA	GW996510	Y
kinesin-like boursin	GW996624	W	pollen coat oleosin-glycine rich protein	GW996552	Y
Trichohyalin	GW996614	W Y	pol polyprotein	DW404885	Y V
tubulin beta-1 chain	GW996499	W Y	pol polyprotein	HO000117	Y
<b>Miscellaneous functions</b>			pol-like protein	DW405116	Y V
2-keto-3-deoxygalactonate kinase	HO000116	W Y	pol-like protein	DW405439	W
77 kDa echinoderm microtubule-associated protein	HO000120	Y V	pol-like protein	CK991467	W Y
alkaline phosphatase domain-containing protein	DW405385	W	pol-like protein	DW405466	W
antistasin	GW996622	Y V	polyADP-ribosyltransferase	GW996608	Y
axoneme-associated protein mst101	DW404975	W	reductase-related protein	GW996600	Y V
bifunctional endo-1,4-beta-xylanase xylA precursor	DW042590	V	response regulator	GW996522	Y V
bromodomain-containing protein	DW042838	W Y	aspartate phosphatase	GW996640	Y
cement precursor protein 3B variant 3	GW996572	Y	ribosomal protein L8	GW996640	Y
chup1 (chloroplast unusual positioning 1)	GW996491	Y V	ribosomal protein L11	GW996534	W V
coatamer subunit beta	HO000136	W	ribosomal protein L11	GW996619	Y V
coiled-coil domain containing 55	GW996582	Y V	ribosomal protein L32	GW996667	Y V
collagen-like protein ScZ.12	HO000122	Y V	ribosomal protein P2	GW996654	Y V
CTD-binding protein rA9	GW996611	Y V	ribosomal protein S20	GW996487	W Y V
			RNA binding motif protein 25	GW996546	Y V
			RWD domain containing 1	GW996616	Y
			salivary gland secretion 3	HO000123	Y
			CG11720-PA		
			salivary gland secretion 1	EE662921	Y V
			CG3047-PA		
			serine/arginine repetitive matrix 1 isoform 2	GW996507	Y V
			sperm-specific protein	GW996631	Y
			PHI-2Bprotein PHI-3		
			structure-specific recognition protein	GW996638	Y



ตารางที่ 2. (ต่อ)

Putative gene <sup>a</sup>	Accession	Pathogen <sup>b</sup>
TMEM9 domain family member B	GW996526	Y
translocation protein 1	GW996606	Y V
transmembrane protein 86A	EE663050	W Y V
truncated magnesium or manganese-dependent protein phosphatase	GW996652	Y V
vegetative cell wall protein	GW996549	W Y V
vitelline membrane outer layer protein I-like protein	EB409350	V

<sup>a</sup>มีความเหมือนกันโปรตีนหรืออื่นใน Genbank จากการเปรียบเทียบด้วย BlastX หรือ BlastN ที่ค่าน้อยกว่า E<sup>-4</sup>

Putative gene <sup>a</sup>	Accession	Pathogen <sup>b</sup>
Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1 protein isoform 1	HO000140	W
zinc finger protein	DW405551	W V
zinc finger protein	CK991529	V
zinc finger protein	GW996659	V
zinc finger, CCHC domain containing 24	GW996593	Y V
zinc finger protein CCCH domain-containing protein	GW996603	Y V
zinc finger protein ZF(C3H)-5	EE662652	V
ZNF180 protein	GW996642	Y

<sup>b</sup>W, WSSV; Y, YHV; V, *Vibrio harveyi*

### ยืนยันผลที่ได้จากการทำ cDNA microarray ด้วย real time RT-PCR

ทำการยืนยันผลที่ได้จากการทำ cDNA microarray ด้วย real time RT-PCR โดยตรวจสอบระดับการ แสดงออกของยีนจำนวน 6 ยีนคือ mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein, cathepsin L, penaeidin 5, hemocyte kazal-type proteinase inhibitor (Pm2), AGAP000432-PA และ ยีนที่เป็น unknown 1 ยีน ซึ่งโดยทั่วไปผลที่ได้จากการทำ real time PCR สอดคล้องกับผลของ microarray (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3. ยืนยันผลการทำ microarray ด้วย real time RT-PCR

GenBank Accession	Pathogen	Microarray (fold change)			QRT - PCR (fold change)		
		6 hpi	24 hpi	48 hpi	6 hpi	24 hpi	48 hpi
DW042937	WSSV	1.28	4.41	2.33	1.59 ± 0.13	111.4 ± 0.0	4.37 ± 1.13
(AGAP000432-PA)	YHV	0.97	1.47	2.00	0.46 ± 0.03	1.70 ± 0.07	15.37 ± 2.54
	<i>V. harveyi</i>	1.06	0.77	0.99	1.45 ± 0.25	1.31 ± 0.10	0.40 ± 0.10
GW996584	WSSV	1.18	2.18	1.01	0.72 ± 0.13	1.97 ± 0.26	1.00 ± 0.21
(Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein)	YHV	0.93	1.18	2.18	1.53 ± 0.15	1.25 ± 0.06	1.85 ± 0.11
	<i>V. harveyi</i>	1.63	1.88	2.00	1.19 ± 0.24	1.86 ± 0.11	1.48 ± 0.14
EF213115	WSSV	0.77	3.75	3.55	0.47 ± 0.14	9.35 ± 0.27	3.77 ± 0.40
(Cathepsin L)	YHV	0.77	2.69	1.68	0.42 ± 0.09	3.91 ± 0.47	1.80 ± 0.10
	<i>V. harveyi</i>	1.02	1.32	1.39	0.54 ± 0.08	1.47 ± 0.02	1.82 ± 0.08
HO004745	WSSV	5.83	0.21	0.75	4.65 ± 0.50	0.22 ± 0.03	1.21 ± 0.17
(Unknown)	YHV	4.16	0.97	1.37	2.27 ± 0.23	1.18 ± 0.03	1.20 ± 0.24
	<i>V. harveyi</i>	2.00	0.30	2.90	8.09 ± 0.44	0.44 ± 0.10	6.92 ± 0.85
GH717907	WSSV	2.60	0.33	0.90	2.78 ± 0.23	0.09 ± 0.01	1.04 ± 0.05
(Penaeidin 5)	YHV	3.83	0.81	0.96	3.88 ± 0.04	1.31 ± 0.00	1.10 ± 0.07
	<i>V. harveyi</i>	0.89	0.30	1.33	1.54 ± 0.15	0.48 ± 0.05	0.84 ± 0.14
BI018075	WSSV	2.1	0.24	0.30	3.09 ± 0.08	0.06 ± 0.00	0.05 ± 0.00
(Hemocyte kazal-type proteinase inhibitor (Pm2))	YHV	2.35	0.45	0.59	6.47 ± 0.06	0.26 ± 0.01	0.29 ± 0.01
	<i>V. harveyi</i>	0.75	0.89	0.84	1.30 ± 0.18	0.81 ± 0.08	0.83 ± 0.06

### 2.4 วิเคราะห์ผลของการวิจัย

จากการตรวจสอบระดับการ แสดงออกของยีนระหว่างกึ่งกลุ่มติดเชื้อและกลุ่มควบคุมด้วย microarray พบจำนวนยีนที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อ WSSV สูงสุด และจำนวนยีนที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* พบน้อยที่สุด การศึกษาของ Wang และคณะ (2008) ได้ตรวจสอบระดับการ แสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงในกึ่งจีน ติดเชื้อ WSSV และ แบคทีเรีย *V. anguillarum* ซึ่งจำนวนยีนที่มีการ แสดงออกเปลี่ยนแปลงไปเมื่อกึ่งติดเชื้อ WSSV สูงกว่า *V. anguillarum* 1.7 เท่า จากการศึกษาของกลุ่มวิจัย เรา เมื่อเปรียบเทียบจำนวนยีนที่แสดงออกเปลี่ยนแปลงไประหว่างกึ่งติดเชื้อ WSSV และ YHV พบว่าจำนวนยีน

ที่แสดงออกเปลี่ยนแปลงไปใน WSSV สูงกว่า YHV และ *Vibrio* 1.7 และ 4.6 เท่าตามลำดับ จำนวนยีนที่แสดงออกเปลี่ยนแปลงไปพบสูงในกึ่งติด WSSV เมื่อเปรียบเทียบกับ YHV หรือแบคทีเรีย *Vibrio* เนื่องจากความรุนแรงในการก่อโรคของ WSSV สูงกว่า YHV หรือ แบคทีเรีย *Vibrio* (Lightner, 1993; Flegel, 2006; Flegel, 2007) ยีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นและลดลงในกึ่งติดเชื้อไวรัสพบสูงสุดในสภาวะที่กึ่งมีอัตราการตายสูงสุด ในขณะที่ยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในกึ่งติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* พบสูงเมื่อกึ่งเริ่มติดเชื้อ แสดงถึงยีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นในกึ่งติด *Vibrio* น่าจะเป็นยีนที่มีความสำคัญต่อภูมิคุ้มกันของกึ่ง ยีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นในกึ่งติดเชื้อไวรัสส่วนหนึ่ง เช่นยีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นเฉพาะที่ 48 h หลังการติดเชื้อซึ่งกึ่งอยู่ในสภาวะใกล้ตาย (moribund stage) อาจสืบเนื่องมาจากไวรัสใช้ประโยชน์ของยีนเหล่านี้ในการก่อโรค (Wang และคณะ 2006; Pongsomboon และคณะ 2008; Prapavorarat และคณะ 2010) และพบว่าในระยะเวลาที่กึ่งมีอัตราการตายสูงสุดจะมีจำนวนยีนที่มีการแสดงออกลดลงมากที่สุด ซึ่งอาจเกิดเนื่องจากไวรัสก่อโรคลดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของ host เพื่อเพิ่มปริมาณและก่อโรค ยีนที่แสดงออกลดลงเมื่อกึ่งติดเชื้อสืบเนื่องจากพยาธิสภาพของกึ่งเอง และจากการลดการทำงานของไวรัส (Wang และคณะ 2006; Kash และคณะ 2006)

### **ยีนกลุ่ม *defense & homeostasis* ที่แสดงออกเพิ่มขึ้น**

ยีนในกลุ่มนี้ที่แสดงออกเพิ่มขึ้นในกึ่งติดเชื้อไวรัสและหรือแบคทีเรีย ได้แก่ antimicrobial peptides (AMPs) (penaeidins, ALF, ALF-like, crustin และ single whey acidic protein), pattern recognition proteins (PRPs) (vesicular mannose-binding lectin, chitin-binding lectin, C-type lectin receptor, ficolin 1-like, PmAV และ minus agglutinin), protease & their inhibitors (papain family cysteine protease containing protein, protease m1 zinc metalloprotease, protease inhibitor, hemocytes kazal-type protease inhibitors, legumain, serine protease inhibitor และ cathepsin L), prophenoloxidase (proPO) system (prophenoloxidase-activating enzymes, prophenoloxidase-activating factor, masquerade-like serine protease-like protein 2 และ alpha-2-macroglobulin), chaperones (heat shock protein70, heat shock protein90 และ dnaK protein), detoxification proteins (copper/zinc superoxide dismutase, glutathione S-transferase mu และ metallothionein family protein) และ clotting proteins (transglutaminase และ coagulation factor VIII-associated protein) ยีนอื่นๆในกลุ่ม *defense & homeostasis* เช่น hemomucin,  $\gamma$ -interferon inducible-lysosomal thiol reductase, laccase 1, thrombospondin, thymosin ยีนส่วนใหญ่ที่แสดงออกเพิ่มขึ้นเหล่านี้ มีรายงานเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ เช่น PRPs โดยทั่วไปทำหน้าที่จดจำสิ่งแปลกปลอมและกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (Medzhitov และ Janeway, 1997; Koizumi และคณะ 1999; Yu และคณะ 1999) ในกึ่ง *PmAV* ซึ่งมี C-type lectin-like domain สามารถยับยั้งการเจริญของไวรัสได้ (Luo และคณะ 2003) แต่อย่างไรก็ตามยีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นจำนวนหนึ่งไม่มีรายงานความเกี่ยวข้องกับการต้านทาน

การติดเชื้อในกุ้งมาก่อน เช่น ficolin I-like protein มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นทั้งในกุ้งติดเชื้อ WSSV และ YHV ในคน ficolins ทำหน้าที่กระตุ้น classical complement pathway และ lectin pathway (Runza และคณะ 2008) Gamma-interferon-inducible-lysosomal thiol reductase (GILT) มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นทั้งในกุ้งติดเชื้อ WSSV และ YHV เช่นกัน จากการศึกษาที่ผ่านมา ใน disk abalone (*Haliotis discus discus*) และ orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) ยีน GILT หรือ GILT-like มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นหลังจากฉีด LPS (De Zoysa และ Lee, 2007; Dan และคณะ 2007) มีรายงาน GILT ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของ T-cell activation (Barjaktarevic และคณะ 2006) ทำลายเชื้อก่อโรคและเซลล์เสื่อมสภาพที่เป็นผลจากการติดเชื้อ (Lackman และ Cresswell, 2006) ยีนในกลุ่ม defense & homeostasis ที่แสดงออกเพิ่มขึ้นเหล่านี้ น่าจะมีส่วนร่วมในการต่อต้านการติดเชื้อของกุ้ง

### **ยีนกลุ่ม cell cycle/DNA synthesis, repair & replication ที่แสดงออกเพิ่มขึ้น**

ยีนในกลุ่มนี้แบ่งเป็น 3 กลุ่มย่อยคือ apoptosis, cell differentiation และ DNA repair mechanisms ยีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นในกุ้งติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองทุกตัว (5 ยีน) จะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในกุ้งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (9 ยีน) และไม่พบยีนในกลุ่มนี้ที่แสดงออกเพิ่มขึ้นในกุ้งติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ apoptosis อย่างเช่น *rbm25* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในกุ้งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว *rbm25* ทำหน้าที่ควบคุมการ splicing ของ apoptotic factors (Zhou และคณะ 2008) โดยทั่วไปกระบวนการ apoptosis ทำหน้าที่กำจัดเซลล์ที่ตายแล้วและทำหน้าที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน (Sahtout และคณะ 2001; Khanobdee และคณะ 2002)

ยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ cell differentiation เช่น tankyrase, growth factor progranulin (GRN) protein, pHyde tumor suppressor gene และ protein VPRBP (HIV-1 Vpr-binding protein) มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นสูงในกุ้งติดเชื้อ WSSV และหรือ YHV อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่ทราบหน้าที่ของยีนในกลุ่ม cell differentiation ที่มีต่อการตอบสนองการติดเชื้อของกุ้ง

ยีนอื่นๆ ในกลุ่มนี้ที่แสดงออกเพิ่มขึ้นคือ ยีนที่เกี่ยวกับ DNA repair mechanisms (double-strand break repair Rad50 ATPase, structural maintenance of chromosomes) การแสดงออกเพิ่มขึ้นของยีนกลุ่มนี้ในกุ้งติดเชื้อส่วนหนึ่งสืบเนื่องจากการรักษาความสมบูรณ์ของ DNA เช่นการติดเชื้อส่งผลให้เกิด reactive oxygen species (ROS) ซึ่งทำลาย DNA (Darbinyan และคณะ 2007; Chung และคณะ 2010)

### **ยีนกลุ่ม signaling & communication ที่แสดงออกเพิ่มขึ้น**

ความสำคัญของยีนในกลุ่มนี้ที่มีต่อการตอบสนองการติดเชื้อในกุ้งยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ในการศึกษาของเรา *cdks10/11* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นสูงทั้งในกุ้งติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย จากรายงานที่ผ่านมา *cdk10* ทำหน้าที่ควบคุม cell cycle ส่วน *cdk11* ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ transcription และ RNA-processing

(Guo และ Stiller, 2004; Pérez-Martín, 2009) นอกจากนี้ยีนที่เกี่ยวข้องกับแคลเซียมหลายๆ ยีน และยีนที่เกี่ยวข้องกับ G protein signal cascade มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในกึ่งติดเชื้อไวรัส รูปแบบการแสดงออกของยีนส่วนใหญ่ที่เกี่ยวข้องกับ G protein signal cascade จะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในระยะสุดท้ายของการติดเชื้อคือที่ 48 h G protein signal cascade เป็นกระบวนการที่สำคัญเกี่ยวกับการส่งสัญญาณในเซลล์ สำหรับความสำคัญของยีนที่เกี่ยวข้องกับแคลเซียมที่มีต่อการติดเชื้อ โดยทั่วไปแคลเซียมมีความสำคัญต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของ host แต่แคลเซียมก็มีความสำคัญกับการก่อโรคของไวรัสเช่นกัน (Cheshenko และคณะ 2003)

### **ยีนกลุ่ม *gene expression, regulation & protein synthesis* ที่แสดงออกเพิ่มขึ้น**

ยีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นในกึ่งติดเชื้อ *Vibrio* คือ transcription factor และ DNA dependent ATPase and helicase สำหรับในกึ่งติดเชื้อไวรัส ยีนที่เกี่ยวข้องกับ transcription ที่แสดงออกเพิ่มขึ้นคือ transcription factor และ transcription regulator ยีนที่เกี่ยวข้องกับ RNA processing คือ ยีนที่ทำงานเกี่ยวกับ splicing (6 ยีน) ยีนที่เกี่ยวข้องกับ RNA modification enzyme (23S rRNA 5-methyluridine methyl-transferase) และ ribosome biogenesis (ribosome biogenesis protein NSA2) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการ translation ได้แก่  $\gamma$  subunits ของ eukaryotic translation initiation factor 2 การแสดงออกเพิ่มขึ้นของยีนกลุ่ม *gene expression, regulation & protein synthesis* อาจสืบเนื่องจากการสังเคราะห์โปรตีนที่จำเป็นต่อระบบภูมิคุ้มกันอย่างเช่น Ets protein ซึ่งเป็น transcription factor มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในกึ่งติดเชื้อไวรัส Ets protein ควบคุมหน้าที่ของเซลล์หลายๆอย่าง ตัวอย่างเช่น growth, apoptosis, development, differentiation และ oncogenic transformation (Oikawa และคณะ 2003) ซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญในการตอบสนองการติดเชื้อของกึ่ง

### **ยีนกลุ่ม *energy & metabolism* ที่แสดงออกเพิ่มขึ้น**

ยีนส่วนใหญ่ที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในกึ่งติดเชื้อไวรัสเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ protein metabolism, glucose & carbohydrate metabolism และ electron transport ยีนในกลุ่มของ protein metabolism ส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม proteasomes และ ubiquitin ในกึ่งติดเชื้อ *Vibrio* ยีนที่เกี่ยวข้องกับ proteasomes และ ubiquitin ที่แสดงออกเพิ่มขึ้นมี 1 ยีนคือ polyubiquitin 2 หน้าที่ของ proteasomes และ ubiquitin ใน eukaryote เกี่ยวข้องกับกระบวนการของเซลล์หลายๆ กระบวนการ เช่น ควบคุม cell cycle, signal transduction, transcriptional regulation, DNA repair, inflammatory response และ antigen presentation (Glickman และ Ciechanover, 2002; Quesada และคณะ 2004) นอกจากนี้ ทำหน้าที่ทำลายโปรตีนที่เสียหายเนื่องจากการติดเชื้อ (Wilkinson, 1999) อย่างไรก็ตามมีรายงานพบการใช้ กระบวนการ ubiquitin ของ host โดยไวรัส ซึ่งในกึ่ง WSSV249 สามารถจับกับ *Litopenaeus vannamei* ubiquitin-conjugating enzyme และเป็นผลให้เกิด ubiquitination ที่ RING-H2 motif (Wang และคณะ 2005) ดังนั้นการที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ ubiquitin

ของกึ่งแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อกึ่งติดเชื้อ ไม่ทราบแน่ชัดสืบเนื่องจากการต่อต้านการติดเชื้อของกึ่งหรือการใช้ประโยชน์ของชิ้นเหล่านี้ของไวรัสเพื่อก่อโรค

นอกจากยีนกลุ่ม protein metabolism ที่แสดงออกเพิ่มขึ้นในกึ่งติดเชื้อไวรัสแล้ว ยีนในกลุ่ม electron transport และ glucose & carbohydrate metabolism เป็นยีนส่วนใหญ่ที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเช่นกัน ในกึ่งติดเชื้อ *Vibrio* ยีนกลุ่ม electron transport และ glucose & carbohydrate metabolism ที่แสดงออกเพิ่มขึ้น ได้แก่ arginase, type 2 และ short-chain alcohol dehydrogenase ตามลำดับ ในกึ่งติดเชื้อไวรัส ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ glycolysis เป็นยีนในกลุ่ม glucose & carbohydrate metabolism ที่พบสูงสุด การแสดงออกเพิ่มขึ้นของยีนกลุ่มนี้ช่วยเพิ่มพลังงานให้กับเซลล์ที่ติดเชื้อ รายงานที่ผ่านมาในกึ่งติดเชื้อ WSSV จากการตรวจสอบยีนหรือโปรตีนที่แสดงออกเปลี่ยนแปลงไปเมื่อกึ่งติดเชื้อด้วย microarray หรือ proteomic พบว่า ยีนในกระบวนการ glycolytic pathway และ electron transport เช่น phosphopyruvate hydratase, fructose 1,6-bisphosphate aldolase, glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, cytochrome c oxidase subunits I และ cytochrome c oxidase subunits IV มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (Leu และคณะ 2007; Wang และคณะ 2007)

นอกจากนี้ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ ATP เป็นอีกกลุ่มหนึ่งที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในกึ่งติดเชื้อไวรัสและหรือแบคทีเรีย ซึ่งคือ ATP synthase gamma subunit และ ATP synthase a chain ผลงานวิจัยของเราสอดคล้องกับการศึกษาของ Wang และคณะ (2007) ที่พบ mitochondrial ATP synthase proteins แสดงออกเพิ่มขึ้นในกึ่งติดเชื้อไวรัส WSSV การแสดงออกเพิ่มขึ้นของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตพลังงาน ช่วยส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ในขณะเดียวกันเป็นการเพิ่มพลังงานเพื่อช่วยไวรัสในการเพิ่มจำนวนด้วยเช่นกัน

### **ยีนกลุ่ม structural & cytoskeleton related protein ที่แสดงออกเพิ่มขึ้น**

ยีนในกลุ่มนี้ที่แสดงออกเพิ่มขึ้นพบเฉพาะในกึ่งติดเชื้อไวรัส ไม่พบในกึ่งติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* จากการศึกษาที่ผ่านมามีไวรัสสามารถใช้ยีนกลุ่มนี้ เข้าออกเซลล์ของ host ในการศึกษาของเรา actins, tubulins, dynein heavy chain และ kinesin-like boursin มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในกึ่งติดเชื้อไวรัส ยีนเหล่านี้ทุกยีนมีรายงานช่วยไวรัสบุกรุก host (Liu และคณะ 1999; Wilk และคณะ 1999; Döhner และ Sodeik, 2004; Jolly และคณะ 2007)

### **ยีนกลุ่ม transport ที่แสดงออกเพิ่มขึ้น**

ยีนในกลุ่มนี้ที่แสดงออกเพิ่มขึ้นพบเฉพาะในกึ่งติดเชื้อไวรัสเช่นกัน ไม่พบในกึ่งติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* การแสดงออกเพิ่มขึ้นของยีนกลุ่ม transport เป็นผลเนื่องจากการต่อต้านการติดเชื้อของกึ่งและการเพิ่มจำนวนของไวรัส ตัวอย่างเช่น sodium-dependent nutrient amino acid transporter แสดงออกเพิ่มขึ้นในกึ่งติดเชื้อไวรัส WSSV กรดอะมิโนจำเป็นในการสังเคราะห์โปรตีน ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์

bioactive molecules หลายๆชนิดและยังเป็นแหล่งพลังงาน (Hames และคณะ 1997) ยีนที่เกี่ยวข้องกับ clathrin-mediated transport เช่น clathrin coat assembly protein ap17 และ AP-3 complex subunit beta-1 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในกุ้งติดเชื้อไวรัส การแสดงออกเพิ่มขึ้นของยีนที่เกี่ยวข้องกับ clathrin-mediated transport อาจสืบเนื่องจากการใช้ยีนเหล่านี้เพื่อเข้าสู่เซลล์ของไวรัส โดยทั่วไป endocytosis ของไวรัสสามารถใช้ clathrin (Gao และคณะ 2005; Kirchhausen, 2009) V-type H<sup>+</sup> ATPase (V-ATPase) ทำหน้าที่รักษาสมดุลกรด-ด่าง เซลล์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันเช่น macrophages V-ATPase ช่วยขับกรดออกเพื่อลดความเป็นกรดของเซลล์ ซึ่งการรักษาสมดุลกรด-ด่างมีความสำคัญในการทำงานของ macrophages (De Vito และคณะ 2006)

## 2.5 สรุปผลของการวิจัย

จากการศึกษา พบยีนจำนวนหนึ่งที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการต่อต้านการติดเชื้อไวรัส WSSV, ไวรัส YHV และ แบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ของกุ้งกุลาดำ กุ้งติดเชื้อ WSSV มีผลทำให้ยีนมีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปเป็นจำนวนมากเมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งติดเชื้อไวรัส YHV และ แบคทีเรีย *Vibrio* อย่างไรก็ตามยีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อกุ้งติดเชื้อมีทั้งยีนที่ทำหน้าที่ในการต่อต้านการติดเชื้อ และ ยีนที่ไวรัสใช้ประโยชน์ในการก่อโรคของกุ้ง ยีนที่น่าจะมีความสำคัญต่อภูมิคุ้มกันของกุ้ง เช่น ยีนในกลุ่ม defense & homeostasis, กลุ่ม cell cycle/DNA synthesis, repair & replication และกลุ่ม energy & metabolism การศึกษานี้ช่วยบ่งชี้ถึงยีนที่น่าจะนำไปศึกษาต่อ เพื่อให้เข้าใจในกระบวนการต้านไวรัสหรือแบคทีเรีย รวมทั้งการนำไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันโรคติดเชื้อของกุ้ง เช่น การประยุกต์ใช้ประโยชน์จากยีน เพื่อควบคุมการติดเชื้อในกุ้ง การคัดสายพันธุ์ต้านทานโรคของกุ้ง เป็นต้น ซึ่งจะเป็ประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้ง

## บรรณานุกรม

- Ai, HS., Liao, JX., Huang, XD., Yin, ZX., Weng, SP. and Zhao, ZY. 2009. A novel prophenoloxidase 2 exists in shrimp hemocytes. *Dev Comp Immunol*, 33: 59-68.
- Amparyup, P., Charoensapri, W. and Tassanakajon, A. 2009. Two prophenoloxidases are important for the survival of *Vibrio harveyi* challenged shrimp *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol*, 33: 247-56.
- Amparyup, P., Kondo, H., Hirono, I., Aoki, T. and Tassanakajon, A. 2008. Molecular cloning, genomic organization and recombinant expression of a crustin-like antimicrobial peptide from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Mol Immunol*, 45: 1085-93.
- Amparyup, P., Wiriyaikaradecha, K., Charoensapri, W. and Tassanakajon, A. 2010. A clip domain serine proteinase plays a role in antibacterial defense but is not required for prophenoloxidase activation in shrimp. *Dev Comp Immunol*, 34: 168-176.
- Barjaktarevic, I., Rahman, A., Radoja, S., Bogunovic, B., Vollmer, A. and Vukmanovic, S. 2006. Inhibitory role of IFN- $\gamma$ -inducible lysosomal thiol reductase in T cell activation. *J Immunol*, 177: 4369-75.
- Cerenius, L. and Söderhäll, K. 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol Rev*, 198: 116-26.
- Charoensapri, W., Amparyup, P., Hirono, I., Aoki, T. and Tassanakajon, A. 2009. Gene silencing of a prophenoloxidase activating enzyme in the shrimp, *Penaeus monodon*, increases susceptibility to *Vibrio harveyi* infection. *Dev Comp Immunol*, 33: 811-20.
- Cheshenko, N., Del, Rosario, B., Woda, C., Marcellino, D., Satlin, LM. and Herold, BC. 2003. Herpes simplex virus triggers activation of calcium-signaling pathways. *J Cell Biol*, 163: 283-93.
- Chung, LY., Wang, LC., Chen, CH., Lin, HY. and Yen, CM. 2010. Kinetic change of oxidative stress in cerebrospinal fluid of mice infected with *Angiostrongylus cantonensis*. *Redox Rep*, 15: 43-48.
- Dan, WB., Ren, F., Zhang, C. and Zhang, SQ. 2007. Molecular cloning and expression analysis of interferon- $\gamma$ -inducible-lysosomal thiol reductase gene in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish Shellfish Immunol*, 23: 1315-23.
- Darbinyan, A., White, MK. and Akan, S. 2007. Radhakrishnan S, Del Valle L, Amini S, et al. Alterations of DNA damage repair pathways resulting from JCV infection. *Virology*, 364: 73-86.
- De, Vito, P. 2006. The sodium/hydrogen exchanger: a possible mediator of immunity. *Cell Immunol*, 240: 69-85.
- De, Zoysa, M. and Lee, J. 2007. Molecular cloning and expression analysis of interferon- $\gamma$ -inducible lysosomal thiol reductase (GILT)-like cDNA from disk abalone (*Haliotis discus discus*). *J Invertebr Pathol*, 96: 221-9.
- Dhar, AK., Dettori, A., Roux, MM. and Klimpel, KR. 2003. Read B. Identification of differentially expressed genes in shrimp (*Penaeus stylirostris*) infected with White spot syndrome virus by cDNA microarrays. *Arch Virol*, 148: 2381-96.
- Donpudsa, S., Tassanakajon, A. and Rimphanitchayakit, V. 2009. Domain inhibitory and bacteriostatic activities of the five-domain Kazal-type serine proteinase inhibitor from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol*, 33(4): 481-8.
- Döhner, K. and Sodeik, B. 2004. The role of the cytoskeleton during viral infection. *Curr Top Microbiol*, 285: 67-108.
- Flegel, TW. 2006. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture*, 258: 1-33.
- Flegel, TW. 2007. Update on viral accommodation, a model for host-viral interaction in shrimp and other arthropods. *Dev Comp Immunol*, 31: 217-31.
- Flegel, TW., Nielsen, L., Thamavit, V., Kongtim, S. and Pasharawipas, T. 2004. Presence of multiple viruses in non-diseased, cultivated shrimp at harvest. *Aquaculture*, 240: 55-68.
- Gao, H. and Shi, W. 2005. Freund LB. Mechanics of receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 9469-74.
- Glass, EJ. and Jensen, K. 2007. Resistance and susceptibility to a protozoan parasite of cattle gene expression differences in macrophages from different breeds of cattle. *Vet Immunol Immunopathol*, 120: 20-30.
- Glickman, MH. and Ciechanover, A. 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*, 82: 373-428.



- Guo, Z. and Stiller, JW. 2004. Comparative genomics of cyclin-dependent kinases suggest co-evolution of the RNAP II C-terminal domain and CTD-directed CDKs. *BMC Genomics*, 5: art no 69.
- Hames, BD., Hooper, NM. and Houghton, JD. 1997. *Instant Notes in biochemistry*. Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers Limited.
- Jiang, H. and Kanost, MR. 2000. The clip-domain family of serine proteinases in arthropods. *Insect Biochem Mol Biol*, 30: 95–105.
- Jitvaropas, R., Amparyup, P., Gross, PS. and Tassanakajon, A. 2009. Functional characterization of a masquerade-like serine proteinase homologue from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Comp Biochem Physiol B*, 153: 236–43.
- Jolly, C., Mítar, I. and Sattentau, QJ. 2007. Requirement for an intact T-cell actin and tubulin cytoskeleton for efficient assembly and spread of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 81: 5547-60.
- Jørgensen, SM., Afanasyev, S. and Krasnov, A. 2008. Gene expression analyses in Atlantic salmon challenged with infectious salmon anemia virus reveal differences between individuals with early, intermediate and late mortality. *BMC Genomics*, 9: 179.
- Kash, JC., Muhlberger, E., Carter, V., Grosch, M., Perwitasari, O. and Proll, SC. 2006. Global suppression of the host antiviral response by Ebola- and Marburgviruses: increased antagonism of the type I interferon response is associated with enhanced virulence. *J Virol*, 80: 3009-20.
- Khanobdee, K., Soowannayan, C., Flegel, TW., Ubol, S. and Withyachumnarnkul, B. 2002. Evidence for apoptosis correlated with mortality in the giant black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with yellow head virus. *Dis Aquat Organ*, 48: 79-90.
- Kirchhausen, T. 2009. Imaging endocytic clathrin structures in living cells. *Trends Cell Biol*, 19: 596-605.
- Koizumi, N., Imamura, M., Kadotani, T., Yaoi, K., Iwahana, H. and Sato, R. 1999. The lipopolysaccharide-binding protein participating in hemocyte nodule formation in the silkworm *Bombyx mori* is a novel member of the C-type lectin superfamily with two different tandem carbohydrate-recognition domains. *FEBS Lett*, 443: 139-43.
- Kwon, TH., Kim, MS., Choi, HW., Joo, CH., Cho, MY. and Lee, BL. 2000. A masquerade-like serine proteinase homologue is necessary for phenoloxidase activity in the coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia* larvae. *Eur J Biochem*, 267: 6188-96.
- Lackman, RL. and Cresswell, P. 2006. Exposure of the promonocytic cell line THP-1 to *Escherichia coli* induces IFN- $\gamma$ -inducible lysosomal thiol reductase expression by inflammatory cytokines. *J Immunol*, 177: 4833-40.
- Lee, SY., Cho, MY., Hyun, JH., Lee, KM., Homma, KI., Natori, S., Kawabata, SI., Iwanaga, S. and Lee, BL. 1998b. Molecular cloning of cDNA for pro-phenoloxidase-activating factor I, a serine protease is induced by lipopolysaccharide or 1,3- $\beta$ -glucan in coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia* larvae. *Eur. J. Biochem*, 257: 615–621.
- Lee, SY., Kwon, TH., Hyun, JH., Choi, JS., Kawabata, SI., Iwanaga, S. and Lee, BL. 1988a. In vitro activation of pro-phenol-oxidase by two kinds of pro-phenoloxidase-activating factors isolated from hemolymph of coleopteran *Holotrichia diomphalia* larvae. *Eur J Biochem*, 254: 50–57.
- Lee, SY., Wang, R. and Söderhäll, K. 2000. A lipopolysaccharide- and beta-1,3-glucan-binding protein from hemocytes of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Purification, characterization, and cDNA cloning. *J Biol Chem*, 275(2): 1337-43.
- Liu, H., Jiravanichpaisal, P., Cerenius, L., Lee, BL., Söderhäll, I. and Söderhäll, K. 2007. Phenoloxidase is an important component of the defense against *Aeromonas hydrophila* infection in a crustacean, *Pacifastacus leniusculus*. *J Biol Chem*, 282: 33593–8
- Leu, JH., Chang, CC., Wu, JL., Hsu, CW., Hirono, I. and Aoki, T. 2007. Comparative analysis of differentially expressed genes in normal and white spot syndrome virus infected *Penaeus monodon*. *BMC Genomics*, 8: 120.
- Leu, JH., Kuo, YC., Kou, GH. and Lo, CF. 2008. Molecular cloning and characterization of an inhibitor of apoptosis protein (IAP) from the tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol*, 32: 121-33.
- Lightner, DV. 1993. Diseases of cultured penaeid shrimps. In: Mc Vey JP, editor. *CRC handbook of mariculture*, 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 393-486.
- Liu, B., Dai, R., Tian, CJ., Dawson, L., Gorelick, R. and Yu, XF. 1999. Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid with actin. *J Virol*, 73: 2901-8.
- Luo, T., Zhang, X., Shao, Z. and Xu, X. 2003. PmAV, a novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon*. *FEBS Lett*, 551:

- Medzhitov, R. and Janeway, CA, Jr. 2003. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, 91: 295-8.
- Oikawa, T. and Yamada, T. 2003. Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene*, 303: 11-34.
- Peatman, E., Terhune, J., Baoprasertkul, P., Xu, P., Nandi, S. and Wang, S. 2008. Microarray analysis of gene expression in the blue catfish liver reveals early activation of the MHC class I pathway after infection with *Edwardsiella ictaluri*. *Mol Immunol*, 45: 553-66.
- Pérez-Martín, J. 2009. DNA-damage response in the basidiomycete fungus *Ustilago maydis* relies in a sole Chk1-like kinase. *DNA Repair (Amst)*, 8: 720-31.
- Phongdara, A., Wanna, W. and Chotigeat, W. 2006. Molecular cloning and expression of caspase from white shrimp *Penaeus merguensis*. *Aquaculture*, 252: 114-20.
- Pongsomboon, S., Tang, S., Boonda, S., Aoki, T., Hirono, I. and Yasuike, M. 2008. Differentially expressed genes in *Penaeus monodon* hemocytes following infection with yellow head virus. *BMB Rep*, 41: 670-7.
- Ponprateep, S., Somboonwivat, K. and Tassanakajon, A. 2009. Recombinant anti-lipoplysaccharide factor isoform 3 and the prevention of vibriosis in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 289: 219-24.
- Prapavorarat, A., Pongsomboon, S. and 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. *Dev Comp Immunol*, 34: 611-7.
- Quesada, V., Diaz-Perales, A., Gutiérrez-Fernández, A., Garabaya, C., Cal, S. and López-Otin, C. 2004. Cloning and enzymatic analysis of 22 novel human ubiquitin-specific proteases. *Biochem Biophys Res Commun*, 314: 54-62.
- Rimphanitchayakit, V. and Tassanakajon, A. 2010. Structure and function of invertebrate Kazal-type serine proteinase inhibitors. *Dev Comp Immunol*, 34: 377-86.
- Runza, VL., Schwaeble, W. and Mannel, DN. 2008. Ficolins: Novel pattern recognition molecules of the innate immune response. *Immunobiology*, 213: 297-306.
- Sahtout, AH., Hassan, MD. and Shariff, M. 2001. DNA fragmentation, an indicator of apoptosis, in cultured black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white spot syndrome virus (WSSV). *Dis Aquat Organ*, 44: 155-9.
- Sritunyalucksana, K., Lee, SY. and Söderhäll, K. 2002. A beta-1,3-glucan binding protein from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol*, 26(3): 237-45.
- Somboonwivat, K., Marcos, M., Tassanakajon, A., Klinbunga, S., Aumelas, A., Romestand, B., Gueguen, Y., Boze, H., Moulin, G. and Bachere, E. 2005. Recombinant expression and anti-microbial activity of anti-lipoplysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol*, 29: 841-51.
- Somprasong, N., Rimphanitchayakit, V. and Tassanakajon, A. 2006. A five-domain Kazal-type serine proteinase inhibitor from black tiger shrimp *Penaeus monodon* and its inhibitory activities. *Dev Comp Immunol*, 30: 998-1008.
- Supungul, P., Tang, S., Maneeruttanarungroj, C., Rimphanitchayakit, V., Hirono, I., Aoki, T. and Tassanakajon, A. 2008. Cloning, expression and antimicrobial activity of crustin *Pm1*, a major isoform of crustin, from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol*, 32: 61-70.
- Sun, J., Wang, L., Wang, B., Guo, Z., Liu, M. and Jiang, K. 2008a. Purification and characterization of a natural lectin from the plasma of the shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol*, 25: 290-7.
- Sun, YD., Fu, LD., Jia, YP., Du, XJ., Wang, Q. and Wang, YH. 2008b. A hepatopancreas-specific C-type lectin from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* exhibits antimicrobial activity. *Mol Immunol*, 45: 348-61.
- Tassanakajon, A., Amparyup, P., Somboonwivat, K. and Supungul, P. 2010. Cationic antimicrobial peptides in penaeid shrimp. *Mar Biotechnol (NY)*, 12: 487-505.
- Tassanakajon, A., Klinbunga, S., Paunglar, N., Rimphanitchayakit, V., Udomkit, A., Jitrapakdee, S., Sritunyalucksana, K., Phongdara, A., Pongsomboon, S., Supungul, P., Tang, S., Kuphanumart, K., Pichyangkura, R. and Lursinsap, C. 2006. *Penaeus monodon* gene discovery project: the generation of proteasomes a database. *Gene*, 384: 104-12.

- Tharntada, S., Ponprateep, S., Somboonwiwat, K., Liu, H., Soderhall, I., Soderhall, K., Tassanakajon, A. 2009. Role of anti-lipopolysaccharide factor from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, in protection from white spot syndrome virus infection. *J Gen Virol*, 90: 1491-8.
- Wang, B., Li, F., Dong, B., Zhang, X., Zhang, C., Xiang, J. 2006. Discovery of the genes in response to white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Fenneropenaeus chinensis* through cDNA microarray. *Mar Biotechnol (NY)*, 8: 491-500.
- Wang, B., Li, F., Luan, W., Xie, Y., Zhang, C., Luo, Z. 2008. Comparison of gene expression profiles of *Fenneropenaeus chinensis* challenged with WSSV and *Vibrio*. *Mar Biotechnol (NY)*, 10: 664-75.
- Wang, HC., Wang, HC., Leu, JH., Kou, GH., Wang, AH., Lo, CF. 2007. Protein expression profiling of the shrimp cellular response to white spot syndrome virus infection. *Dev Comp Immunol*, 31: 672-86.
- Wang, Z., Chua, HK., Gusti, AA., He, F., Fenner, B., Manopo, I. 2005. RING-H2 protein WSSV249 from white spot syndrome virus sequesters a shrimp ubiquitin-conjugating enzyme, PvUbc, for viral pathogenesis. *J Virol*, 79: 8764-72.
- Wang, ZH., Zhao, XF., Wang, JX. 2009a. Characterization, kinetics, and possible function of Kazal-type proteinase inhibitors of Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol*, 26: 885-97.
- Wilk, T., Gowen, B., Fuller, SD. 1999. Actin associates with the nucleocapsid domain of the human immunodeficiency virus Gag polyprotein. *J Virol*, 73: 1931-40.
- Wilkinson, KD. 1999. Ubiquitin-dependent signaling: the role of ubiquitination in the response of cells to their environment. *J Nutr*, 129: 1933-6.
- Wongpanya, R., Aoki, T., Hirono, I., Yasuik, M., Tassanakajon, A. 2007. Analysis of gene expression in haemocytes of shrimp *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus by cDNA microarray. *ScienceAsia*, 33: 165-74.
- Yu, XQ., Gan, H., Kanost, MR. 1999. Immulectin, an inducible C-type lectin from an insect, *Manduca sexta*, stimulates activation of plasma prophenol oxidase. *Insect Biochem Mol Biol*, 29: 585-97.
- Zhao, ZY., Yin, ZX., Xu, XP., Weng, SP., Rao, XY., Dai, ZX. 2009. A novel C-type lectin from the shrimp *Litopenaeus vannamei* possesses anti-white spot syndrome virus activity. *J Virol*, 83: 347-56.
- Zhou, A., Ou, AC., Cho, A., Benz, EJ., Jr, Huang, SC. 2008. Novel splicing factor RBM25 modulates Bcl-x pre-mRNA 5' splice site selection. *Mol Cell Biol*, 28: 5924-36.

## ภาคผนวก

### ผลงานตีพิมพ์พื้นฐาน ISI ที่มีค่า impact factor

1. Charoensapsri, W., Amparyup, P., Hirono, I., Aoki, T. and Tassanakajon, A. 2011. *PmPPAE2*, a new class of crustacean prophenoloxidase (proPO)-activating enzyme and its role in PO activation. *Developmental and Comparative Immunology*, 35: 115-24. (Impact Factor 2009: 3.290)
2. Pongsomboon, S., Tang, S., Boonda, S., Aoki, T., Hirono, I. and Tassanakajon, A. 2011. A cDNA microarray approach for analyzing transcriptional changes in *Penaeus monodon* after infection by pathogens. *Fish & Shellfish Immunology*, 30: 439-46. (Impact Factor 2009: 2.892)

### งานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

1. Tassanakajon, A. and Pongsomboon, S. 2010. Shrimp *Penaeus monodon* transcriptomics: Gene identification and functional analysis for understanding immune responses to viral diseases. In Proc. The 7<sup>th</sup> International Crustacean Congress, 20-25 June, 2010, Qingdao, China.
2. Amparyup, P., Sutthangkul, J. and Tassanakajon, A. 2010. Involvement of shrimp lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein prophenoloxidase system. The 9<sup>th</sup> International Marine Biotechnology Conference, 8-12 October, 2010, Qingdao, China.

### งานประชุมวิชาการระดับชาติ

1. Amparyup, P., Charoensapsri, W., Wiriyaucharadecha, K., Hirono, I., Aoki, T. and Tassanakajon, A. 2010. Application of RNA interference to study the gene function in shrimp prophenoloxidase system. The 7<sup>th</sup> National Symposium on Marine Shrimp. 7-8 September 2010. The Twin Lotus Hotel, Nakhonsithammarat. p. 90.
2. Pongsomboon, S., Sookruksawong, S., Tang, S. and Tassanakajon, A. 2010. Identification of candidate genes potentially involved in disease resistance in *Litopenaeus vannamei*. The 7<sup>th</sup> National Symposium on Marine Shrimp. 7-8 September 2010. The Twin Lotus Hotel, Nakhonsithammarat. p. 26.

## ประวัตินักวิจัย และคณะ

ชื่อ-นามสกุล (ไทย)

(อังกฤษ)

ตำแหน่งทางวิชาการ

หน่วยงานที่สังกัด

สถานที่ติดต่อ

ดร. อัญชลี ทศนาขจร

Dr. Anchalee Tassanakajon

ศาสตราจารย์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอนุชีววิทยาและจีโนมกุ้ง

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02-218-5439 โทรศัพท์มือถือ 081-697-7744

โทรสาร 02-218-5418 E-mail anchalee.k@chula.ac.th

## ประวัติการศึกษา

1978-1982 B. Sc. (Chemistry), Chulalongkorn University

1982-1984 M. Sc. (Biochemistry), University of Montana, U.S.A.

1984-1987 Ph. D. (Biochemistry), University of Montana, U.S.A.

## สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

Shrimp Molecular Biology

## ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ย้อนหลัง 5 ปี

1. Suthiantong, P., Pulsook, N., Supungul, P., Tassanakajon, A., Rimphanitchayakit, V. A double WAP domain-containing protein *PmDWD* from the black tiger shrimp *Penaeus monodon* is involved in the controlling of proteinase activities in lymphoid organ. *Fish and Shellfish Immunology*. 30: 783-90 [Impact Factor: 2.892]
2. Imjongjirak, C., Amparyup, P., Tassanakajon, A. (2011). Two novel antimicrobial peptides, arasin-likeSp and GRPSp, from the mud crab *Scylla paramamosain*, exhibit the activity against some crustacean pathogenic bacteria. *Fish and Shellfish Immunology*. 30: 706-12. [Impact Factor: 2.892]
3. Woramongkolchai, N., Supungul, P., Tassanakajon, A. The possible role of penaeidin5 from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, in protection against viral infection. *Developmental and Comparative Immunology*. 35:530-6 [Impact Factor: 3.290]
4. Imjongjirak, C., Amparyup, P., Tassanakajon, A. (2011). Molecular cloning, genomic organization and antibacterial activity of a second isoform of antilipopolsaccharide factor (ALF) from the mud crab, *Scylla paramamosain*. *Fish and Shellfish Immunology*. 30: 58-66. [Impact Factor: 2.892]
5. Charoensapsri, W., Amparyup, P., Hirono, I., Aoki, T., Tassanakajon, A. (2011). *PmPPAE2*, a new class of crustacean prophenoloxidase (proPO)-activating enzyme and its role in PO activation. *Developmental and Comparative Immunology*. 35: 115-24. [Impact Factor: 3.290]

6. Pongsomboon, S., Tang, S., Boonda, S., Aoki, T., Hirono, I., **Tassanakajon, A.** (2011). A cDNA microarray approach for analyzing transcriptional changes in *Penaeus monodon* after infection by pathogens. *Fish and Shellfish Immunol.* 30: 439-446. [**Impact Factor:** 2.892]
7. 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 and Shellfish Immunology.* 29: 716-23. [**Impact Factor:** 2.892]
8. Homvises, T., **Tassanakajon, A.**, Somboonwiwat, K. (2010). *Penaeus monodon* SERPIN, *PmSERPIN6*, is implicated in the shrimp innate immunity. *Fish and Shellfish Immunology.* 29: 890-8. [**Impact Factor:** 2.892]
9. Donpudsa, S., Ponprateep, S., Prapavorarat, A., Visetnan, S., **Tassanakajon, A.**, Rimphanitchayakit, V. (2010). A Kazal-type serine proteinase inhibitor *SPI<sub>Pm2</sub>* from the black tiger shrimp *Penaeus monodon* is involved in antiviral responses. *Developmental and Comparative Immunology.* 34: 1101-8. [**Impact Factor:** 3.290]
10. Somboonwiwat, K., Chaikeratisak, V., Wang, H.C., Fang Lo, C., **Tassanakajon, A.** (2010). Proteomic analysis of differentially expressed proteins in *Penaeus monodon* hemocytes after *Vibrio harveyi* infection. *Proteome Science.* 8: Article Number 39. [**Impact Factor:** 2.564]
11. Prapavorarat, A., Vatanavicharn, T., Soderhall, K., **Tassanakajon, A.** A novel viral responsive protein is involved in hemocyte homeostasis in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Journal of Biological Chemistry.* 285: 21467-21477. [**Impact Factor:** 5.328]
12. Donpudsa, S., Rimphanitchayakit, V., **Tassanakajon, A.**, Soderhall, I., Soderhall, K. Characterization of two crustin antimicrobial peptides from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Invertebrate Pathology.* 104: 234-238. [**Impact Factor:** 1.807]
13. **Tassanakajon, A.**, Amparyup, P., Somboonwiwat, K., Supungul, P. Cationic antimicrobial peptides in penaeid shrimp. *Marine Biotechnology* 12: 487-505. [**Impact Factor:** 2.587] **Review Article**
14. Proespraiwong, P., Tassanakajon, A., Rimphanitchayakit, V. (2010). Chitinases from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*: phylogenetics, expression and activities. *Comparative Biochemistry Physiology-B Biochemistry and Molecular Biology.* 156: 86-96. [**Impact Factor:** 1.607]
15. Supungul, P., Rimphanitchayakit, V., Aoki, T., Hirono, I., **Tassanakajon, A.** (2010). Molecular characterization and expression analysis of a C-type and two novel muramidase-deficient I-type lysozymes from *Penaeus monodon*. *Fish and Shellfish Immunology.* 28: 490-498. [**Impact Factor:** 2.892]
16. 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: 611-617. [**Impact Factor:** 3.290]
17. Rimphanitchayakit, V., Tassanakajon, A. (2010). Structure and function of invertebrate Kazal-type serine proteinase inhibitors. *Developmental and Comparative Immunology.* 34: 377-386. [**Impact Factor:** 3.290] **Review Article**

18. Cerenius, L., Liu, H., Zhang, Y., Rimphanitchayakit, V., **Tassanakajon, A.**, Gunnar Andersson, M., Söderhäll, K., Söderhäll, I. (2010). High sequence variability among hemocyte-specific Kazal-type proteinase inhibitors in decapod crustaceans. *Developmental and Comparative Immunology*. 34: 69-75. [**Impact Factor:** 3.290]
19. Amparyup, P., Wiriyaukaradecha, K., Charoensapsri, W., **Tassanakajon, A.** (2010). A clip domain serine proteinase plays a role in antibacterial defense but is not required for prophenoloxidase activation in shrimp. *Developmental and Comparative Immunology*. 34: 168-176. [**Impact Factor:** 3.290]
20. Amparyup, P., Charoensapsri, W., **Tassanakajon, A.** (2009). Two prophenoloxidases are important for the survival of *Vibrio harveyi* challenged shrimp *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology*. 33: 247-256. [**Impact Factor:** 3.290]
21. Charoensapsri, W., Amparyup, P., Hirono, I., Aoki, T., **Tassanakajon, A.** (2009). Gene silencing of a prophenoloxidase activating enzyme in the shrimp, *Penaeus monodon*, increases susceptibility to *Vibrio harveyi* infection. *Developmental and Comparative Immunology*. 33: 811-820. [**Impact Factor:** 3.290]
22. Donpudsa, S., **Tassanakajon, A.**, Rimphanitchayakit, V. (2009). Domain inhibitory and bacteriostatic activities of the five-domain Kazal-type serine proteinase inhibitor from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology*. 33: 481-488. [**Impact Factor:** 3.290]
23. Jitvaropas, R., Amparyup, P., Gross, P.S., **Tassanakajon, A.** (2009). Functional characterization of a masquerade-like serine proteinase homologue from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*. 153: 236-243. [**Impact Factor:** 1.607]
24. Pongsomboon, S., Udomlertpreecha, S., Amparyup, P., Wuthisuthimethavee, S., **Tassanakajon, A.** (2009). Gene expression and activity of carbonic anhydrase in salinity stressed *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*. 152: 225-233. . [**Impact Factor:** 2.196]
25. Ponprateep, S., Somboonwiwat, K., **Tassanakajon, A.** (2009). Recombinant anti-lipopolysaccharide factor isoform 3 and the prevention of vibriosis in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture*. 289: 219-224. [**Impact Factor:** 1.925]
26. Tharntada, S., Ponprateep, S., Somboonwiwat, K., Liu, H., Söderhäll, I., Söderhäll, K., **Tassanakajon, A.** (2009). Role of anti-lipopolysaccharide factor from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, in protection from white spot syndrome virus infection. *Journal of General Virology*. 90: 1491-1498. [**Impact Factor:** 3.260]
27. Vatanavicharn, T., Supungul, P., Puanglarp, N., Yingvilasprasert, W., **Tassanakajon, A.** (2009). Genomic structure, expression pattern and functional characterization of crustinPm5, a unique isoform of crustin from *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*. 153: 244-252. [**Impact Factor:** 1.607]
28. Visetnan, S., Donpudsa, S., Supungul, P., **Tassanakajon, A.**, Rimphanitchayakit, V. (2009). Kazal-type serine proteinase inhibitors from the black tiger shrimp *Penaeus monodon* and the inhibitory activities of SPIPm4 and 5. *Fish and Shellfish Immunology*. 27: 266-274. [**Impact Factor:** 2.892]

29. Yang, Y., Boze, H., Chemardin, P., Padilla, A., Moulin, G., **Tassanakajon, A.**, Pugnère, M., Roquet, F., Destoumieux-Garzon, D., Gueguen, Y., Bachère, E., Aumelas, A. (2009). NMR structure of rALF-Pm3, an anti-lipoplysaccharide factor from shrimp: Model of the possible lipid A-binding site. *Biopolymers*. 91: 207-220. **[Impact Factor: 2.605]**
30. Fagutao, F.F., Yasuike, M., Santos, M.D., Ruangpan, L., Sangrungruang, K., **Tassanakajon, A.**, Takahashi, Y., Ueno, R., Kondo, H., Hirono, I., Aoki, T. (2009). Differential gene expression in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, following administration of oxytetracycline and oxolinic acid. *Developmental and Comparative Immunology*. 33: 1088-1092. **[Impact Factor: 3.290]**
31. Imjongjirak, C., Amparyup, P., **Tassanakajon, A.**, Sittipraneed, S. (2009). Molecular cloning and characterization of crustin from mud crab *Scylla paramamosain*. *Molecular Biology Reports*. 36: 841-850. **[Impact Factor: 2.038]**
32. Amparyup, P., Kondo, H., Hirono, I., Aoki, T., **Tassanakajon, A.** (2008). Molecular cloning, genomic organization and recombinant expression of a crustin-like antimicrobial peptide from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Molecular Immunology*. 45: 1085-1093. **[Impact Factor: 3.555]**
33. Supungul, P., Tang, S., Maneeruttanarungroj, C., Rimphanitchayakit, V., Hirono, I., Aoki, T., **Tassanakajon, A.** (2008). Cloning, expression and antimicrobial activity of crustinPm1, a major isoform of crustin, from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology*. 32: 61-70. **[Impact Factor: 2.833]**
34. Tharntada, S., Somboonwiwat, K., Rimphanitchayakit, V., **Tassanakajon, A.** (2008). Anti-lipoplysaccharide factors from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, are encoded by two genomic loci. *Fish and Shellfish Immunology*. 24: 46-54. **[Impact Factor: 3.161]**
35. Amparyup, P., Donpuksa, S., **Tassanakajon, A.** (2008). Shrimp single WAP domain (SWD)-containing protein exhibits proteinase inhibitory and antimicrobial activities. *Developmental and Comparative Immunology*. 32: 1497-1509. **[Impact Factor: 2.833]**
36. Somboonwiwat, K., Bachère, E., Rimphanitchayakit, V., **Tassanakajon, A.** (2008). Localization of anti-lipoplysaccharide factor (ALFPm3) in tissues of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and characterization of its binding properties. *Developmental and Comparative Immunology*. 32: 1170-1176. **[Impact Factor: 2.833]**
37. Pongsomboon, S., Tang, S., Boonda, S., Aoki, T., Hirono, I., Yasuike, M., **Tassanakajon, A.** (2008). Differentially expressed genes in *Penaeus monodon* hemocytes following infection with yellow head virus. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 41: 670-677. **[Impact Factor: 2.141]**
38. Pongsomboon, S., Wongpanya, R., Tang, S., Chalorsrikul, A., **Tassanakajon, A.** (2008). Abundantly expressed transcripts in the lymphoid organ of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and their implication in immune function. *Fish and Shellfish Immunology*. 25: 485-493. **[Impact Factor: 3.161]**
39. You, E.M., Chiu, T.S., Liu, K.F., **Tassanakajon, A.**, Klinbunga, S., Triwitayakorn, K., De La Peña, L.D., Li, Y., Yu, H.T. (2008). Microsatellite and mitochondrial haplotype diversity reveals population differentiation in the tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Indo-Pacific region. *Animal Genetics*. 39: 267-277. **[Impact Factor: 2.459]**



40. Amparyup, P., Jitvaropas, R., Pulsook, N., **Tassanakajon, A.** (2007). Molecular cloning, characterization and expression of a masquerade-like serine proteinase homologue from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish and Shellfish Immunology*. 22: 535-546. [Impact Factor: 3.160]
41. Wongpanya, R., Aoki, T., Hirono, I., Yasuik, M., **Tassanakajon, A.** (2007). Analysis of gene expression in haemocytes of shrimp *Penaeus monodon* challenged with white Spot syndrome virus by cDNA microarray. *ScienceAsia*. 33: 165-174.
42. Imjongjirak, C., Amparyup, P., **Tassanakajon, A.**, Sittipraneed, S. (2007). Antilipopolysaccharide factor (ALF) of mud crab *Scylla paramamosain*: Molecular cloning, genomic organization and the antimicrobial activity of its synthetic LPS binding domain. *Molecular Immunology*. 44: 3195-3203. [Impact Factor: 3.742]

ชื่อ-นามสกุล (ไทย)

(อังกฤษ)

ดร. สิริพร พงษ์สมบูรณ์

Siriporn Pongsomboon

ตำแหน่ง

นักวิจัย

หน่วยงานที่สังกัด

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

สถานที่ติดต่อ

ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอนุชีววิทยาและจีโนมกุ้ง

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02-218-5439 โทรศัพท์มือถือ 086-609-6376

โทรสาร 02-218-5414 E-mail siriporn.pon@biotec.or.th

### ประวัติการศึกษา

1989 – 1993

B.Sc. (Medical Technology), Mahidol University

1994 – 1997

M.Sc. (Biotechnology), Chulalongkorn University

1997 – 2002

Ph.D. (Biochemistry), Chulalongkorn University

### สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

Molecular markers

### ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ย้อนหลัง 5 ปี

1. Pongsomboon, S., Tang, S., Boonda, S., Aoki, T., Hirono, I., Tassanakajon, A. (2011). A cDNA microarray approach for analyzing transcriptional changes in *Penaeus monodon* after infection by pathogens. *Fish and Shellfish Immunol.* 30: 439-46. [Impact Factor: 2.892]
2. 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. *Dev Comp Immunol.* 34: 611-617. [Impact Factor: 3.290]
3. Pongsomboon, S., Udomlertpreecha, S., Amparyup, P., Wuthisuthimethavee, S., Tassanakajon, A. (2009). Gene expression and activity of carbonic anhydrase in salinity stressed *Penaeus monodon*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 152: 225-33. [Impact Factor: 2.196]
4. Pongsomboon, S., Tang, S., Boonda, S., Aoki, T., Hirono, I., Yasuike, M., Tassanakajon, A. (2008). Differentially expressed genes in *Penaeus monodon* hemocytes following infection with yellow head virus. *BMB Rep.* 41: 670-7. [Impact Factor: 2.141]
5. Pongsomboon, S., Wongpanya, R., Tang, S., Chalorsrikul, A., Tassanakajon, A. (2008). Abundantly expressed transcripts in the lymphoid organ of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and their implication in immune function. *Fish Shellfish Immunol.* 25: 485-493. [Impact Factor: 2.141]

ชื่อ-นามสกุล (ไทย)	ดร. ปิติ อัมพารยัพ
(อังกฤษ)	Dr. Piti Amparyup
ตำแหน่ง	นักวิจัย
หน่วยงานที่สังกัด	ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
สถานที่ติดต่อ	ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอนุชีววิทยาและจีโนมกุ้ง ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 02-218-5414 โทรศัพท์มือถือ 084-759-0907 โทรสาร 02-218-5414 E-mail piti.amp@biotec.or.th

### ประวัติการศึกษา

1996 B.Sc. (Animal Production Technology), Mahidol University, Bangkok Thailand  
 1999 M.Sc. (Biochemistry), Chulalongkorn University, Thailand  
 2004 Ph.D. (Biotechnology), Chulalongkorn University, Thailand

### สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

Shrimp Molecular Biology

### ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ย้อนหลัง 5 ปี

1. Imjongjirak, C., **Amparyup, P.**, Tassanakajon, A. (2011). Two novel antimicrobial peptides, arasin-likeSp and GRPSP, from the mud crab *Scylla paramamosain*, exhibit the activity against some crustacean pathogenic bacteria. *Fish and Shellfish Immunology*. 30: 706-12. [Impact Factor: 2.892]
2. Imjongjirak, C., **Amparyup, P.**, Tassanakajon, A. (2011). Molecular cloning, genomic organization and antibacterial activity of a second isoform of antilipoplysaccharide factor (ALF) from the mud crab, *Scylla paramamosain*. *Fish and Shellfish Immunology*. 30: 58-66. [Impact Factor: 2.892]
3. Charoensapsri, W., **Amparyup, P.**, Hirono, I., Aoki, T., Tassanakajon, A. (2011). PmPPAE2, a new class of crustacean prophenoloxidase (proPO)-activating enzyme and its role in PO activation. *Developmental and Comparative Immunology*. 35: 115-24. [Impact Factor: 3.290]
4. Tassanakajon, A., **Amparyup, P.**, Somboonwivat, K., Supungul, P. Cationic antimicrobial peptides in penaeid shrimp. *Marine Biotechnology* 12: 487-505. [Impact Factor: 2.587] Review Article
5. **Amparyup, P.**, Wiriyaakradecha, K., Charoensapsri, W., Tassanakajon, A. (2010). A clip domain serine proteinase plays a role in antibacterial defense but is not required for prophenoloxidase activation in shrimp. *Developmental and Comparative Immunology*. 34:168-176. [Impact Factor: 3.290]
6. **Amparyup, P.**, Charoensapsri, W., Tassanakajon, A. (2009). Two prophenoloxidases are important for the survival of *Vibrio harveyi* challenged shrimp *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology*. 33: 247-256. [Impact Factor: 3.290]

7. Charoensapsri, W., **Amparyup, P.**, Hirono, I., Aoki, T., Tassanakajon, A. (2009). Gene silencing of a prophenoloxidase activating enzyme in the shrimp, *Penaeus monodon*, increases susceptibility to *Vibrio harveyi* infection. *Developmental and Comparative Immunology*. 33: 811-820. [**Impact Factor:** 3.290]
8. Jitvaropas, R., **Amparyup, P.**, Gross, P.S., Tassanakajon, A. (2009). Functional characterization of a masquerade-like serine proteinase homologue from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*. 153: 236-243. [**Impact Factor:** 1.607]
9. Pongsomboon, S., Udomlertprecha, S., **Amparyup, P.**, Wuthisuthimethavee, S., Tassanakajon, A. (2009). Gene expression and activity of carbonic anhydrase in salinity stressed *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*. 152: 225-233. . [**Impact Factor:** 2.196]
10. Imjongjirak, C., **Amparyup, P.**, Tassanakajon, A., Sittipraneed, S. (2009). Molecular cloning and characterization of crustin from mud crab *Scylla paramamosain*. *Molecular Biology Reports*. 36: 841-850. [**Impact Factor:** 2.038]
11. **Amparyup, P.**, Kondo, H., Hirono, I., Aoki, T., Tassanakajon, A. (2008). Molecular cloning, genomic organization and recombinant expression of a crustin-like antimicrobial peptide from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Molecular Immunology*. 45: 1085-1093. [**Impact Factor:** 3.555]
12. **Amparyup, P.**, Donpudsa, S., Tassanakajon, A. (2008). Shrimp single WAP domain (SWD)-containing protein exhibits proteinase inhibitory and antimicrobial activities. *Developmental and Comparative Immunology*. 32: 1497-1509. [**Impact Factor:** 2.833]
13. **Amparyup, P.**, Jitvaropas, R., Pulsook, N., Tassanakajon, A. (2007). Molecular cloning, characterization and expression of a masquerade-like serine proteinase homologue from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish and Shellfish Immunology*. 22: 535-546. [**Impact Factor:** 3.160]
14. Imjongjirak, C., **Amparyup, P.**, Tassanakajon, A., Sittipraneed, S. (2007). Antilipopolysaccharide factor (ALF) of mud crab *Scylla paramamosain*: Molecular cloning, genomic organization and the antimicrobial activity of its synthetic LPS binding domain. *Molecular Immunology*. 44: 3195-3203. [**Impact Factor:** 3.742]

ชื่อ-นามสกุล (ไทย)

(อังกฤษ)

ตำแหน่ง

หน่วยงานที่สังกัด

สถานที่ติดต่อ

นางสาว สุรรัตน์ แซ่ตั้ง

Sureerat Tang

ผู้ช่วยนักวิจัย

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอนุชีววิทยาและจีโนมกุ้ง

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02-218-5414 โทรศัพท์มือถือ 086-777-4969

โทรสาร 02-218-5414 E-mail sureerat.tan@biotec.or.th

ประวัติการศึกษา

1994-1997 Bachelor of Science (Biochemistry), Chulalongkorn University

1999-2002 Master of Science (Biochemistry), Chulalongkorn University

สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ

Bioinformatics, Molecular Marker

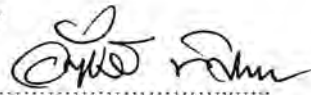
ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ย้อนหลัง 5 ปี

1. Pongsomboon, S., **Tang, S.**, Boonda, S., Aoki, T., Hirono, I., Tassanakajon, A. (2011). A cDNA microarray approach for analyzing transcriptional changes in *Penaeus monodon* after infection by pathogens. *Fish and Shellfish Immunol.* 30: 439-46. [**Impact Factor:** 2.892]
2. Pongsomboon, S., **Tang, S.**, Boonda, S., Aoki, T., Hirono, I., Yasuike, M., Tassanakajon, A. (2008). Differentially expressed genes in *Penaeus monodon* hemocytes following infection with yellow head virus. *BMB Rep.* 41: 670-7. [**Impact Factor:** 2.141]
3. Pongsomboon, S., Wongpanya, R., **Tang, S.**, Chalorsrikul, A., Tassanakajon, A. (2008). Abundantly expressed transcripts in the lymphoid organ of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and their implication in immune function. *Fish Shellfish Immunol.* 25: 485-493. [**Impact Factor:** 3.161]
4. Supungul, P., **Tang, S.**, Maneeruttanarungroj, C., Rimphanitchayakit, V., Hirono, I., Aoki, T., Tassanakajon, A. (2008). Cloning, expression and antimicrobial activity of crustinPm1, a major isoform of crustin, from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol.* 32: 61-70. [**Impact Factor:** 2.833]

สัญญาเลขที่ CU-CLUSTER-FOOD-3-39-53  
 โครงการวิจัย เรื่อง อุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งที่ยั่งยืน : เทคโนโลยีชีวภาพ  
 เพื่อการเลี้ยงกุ้งระบบปิดครบวงจรปี  
 รายงานการรับ-จ่ายเงิน

<u>รายได้</u>	ประมาณการ	งบที่เกิดขึ้นจริง
เงินอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน	670,000.00	670,000.00
รวมรายได้	<u>670,000.00</u>	<u>670,000.00</u>
<u>รายจ่าย</u>		
<u>หมวดค่าจ้างชั่วคราว</u>	<b>60,000.00</b>	<b>60,000.00</b>
ค่าจ้างผู้ช่วยวิจัย (วุฒิปริญญาโท 10,000x1คนx6เดือน)	60,000.00	60,000.00
<u>หมวดค่าใช้สอย</u>	<b>360,000.00</b>	<b>190,676.00</b>
ค่าจ้างเก็บข้อมูลภาคสนาม	200,000.00	32,565.00
ค่าจ้างวิเคราะห์ตัวอย่าง	100,000.00	86,849.00
ค่าจ้างเหมาคิดต่อประสานงาน	45,000.00	55,000.00
ค่าถ่ายเอกสาร	5,000.00	6,650.00
ค่าจัดทำรายงาน	5,000.00	5,000.00
ค่าสืบค้นข้อมูล	3,000.00	3,000.00
ค่าโทรศัพท์ โทรสาร ไปรษณีย์	2,000.00	1,612.00
<u>หมวดค่าวัสดุ</u>	<b>250,000.00</b>	<b>419,269.73</b>
ค่าวัสดุสำนักงาน	5,000.00	4,434.00
ค่าวัสดุคอมพิวเตอร์	5,000.00	6,291.60
ค่าวัสดุวิทยาศาสตร์-สารเคมี	155,000.00	345,614.13
ค่าตัวอย่างสัตว์ทดลองและอาหารสัตว์	85,000.00	62,930.00
รวมรายจ่าย	<u>670,000.00</u>	<u>669,945.73</u>
รายรับสูงกว่ารายจ่าย นำส่งส่วนการคลังจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (เอกสารแนบ)		<b>54.27</b>
คอกเบี้ย (ถ้ามี)		-
รวมจำนวนเงินที่นำส่งส่วนการคลังทั้งสิ้น		<b><u>54.27</u></b>

ขอรับรองว่ารายงานการรับ-จ่ายเงินข้างต้นเป็นความจริงทุกประการ



(ศาสตราจารย์ ดร.อัญชลี ทศนาขจร)

หัวหน้าโครงการวิจัยฯ

หมายเหตุ: รายงานตลอดโครงการเมื่อสิ้นสุดโครงการ/ปิดโครงการ