

การแยกและศึกษาคุณสมบัติของยีน Toll receptor และ hemocyanin ของกุ้งก้ามกราม



ปริญญานิพนธ์
ของ
ชุตินา ศรีสุข

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
เมษายน 2559

การแยกและศึกษาคุณสมบัติของยีน Toll receptor และ hemocyanin ของกุ้งก้ามกราม



ปริญญานิพนธ์
ของ
ชุตินา ศรีสุข

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

เมษายน 2559

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การแยกและศึกษาคุณสมบัติของยีน Toll receptor และ hemocyanin ของกุ้งก้ามกราม



บทคัดย่อ
ของ
ชุดิมา ศรีสุข

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

เมษายน 2559

ชุตติมา ศรีสุข. (2559). การแยกและศึกษาคุณสมบัติของยีน *Toll receptor* และ *hemocyanin* ของกิ้งก่ามกราคม. ปรินญาณินพนธ์ ปร.ด. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: รองศาสตราจารย์ ดร. ปรินทร์ชัยวิสุทธิทางกูร, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์, ดร. แสงจันทร์ เสนาปิ่น.

ตัวรับ Toll (Toll receptor) จัดอยู่ในตระกูล pattern recognition receptor (PRR) ซึ่งมีการวิวัฒนาการมายาวนาน โดยมีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ในการศึกษานี้ได้แยกยีน *Toll receptor* ของกิ้งก่ามกราคมได้สำเร็จและให้ชื่อว่า *MrToll* ซึ่งมีกรอบการอ่านที่มีความยาว 2,799 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นโปรตีนความยาว 932 หน่วย โปรตีน *MrToll* ประกอบด้วยบริเวณต่างๆ ที่เป็นคุณสมบัติของ Toll like receptor (TLR) โดยมีส่วนของ extracellular domain ที่ประกอบด้วย leucine-rich repeats (LRRs) 15 บริเวณ มีส่วนของกรดอะมิโนที่เป็น transmembrane segment 23 หน่วย และส่วนของ cytoplasmic Toll/Interleukin-1R (TIR) domain ความยาว 139 หน่วย การวิเคราะห์ phylogenetics พบว่า *MrToll* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *MjToll* ในกิ้ง *Marsupenaeus japonicus* อย่างไรก็ดีตามโปรตีน *MrToll* มีความเหมือนกับ Toll receptor ในกลุ่มที่ 1 ของกิ้งเพียงร้อยละ 48-49 จึงเสนอว่า *MrToll* ที่แยกได้จากงานวิจัยนี้น่าจะจัดเป็นกลุ่มใหม่ของ Toll receptor ในกิ้ง การแสดงออกของยีน *MrToll* แสดงออกในเนื้อเยื่อต่างๆ หลายชนิด โดยจะแสดงออกมากใน hemocytes, stomach และ muscle การศึกษาโดยวิธี semi-quantitative RT-PCR แสดงให้เห็นว่ามีการแสดงออกของยีน *MrToll* ในระดับที่แตกต่างกันหลังจากถูกกระตุ้นด้วย *Aeromonas caviae* โดยระดับการแสดงออกของ *MrToll* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหลังจากกิ้งติดเชื้อ *A. caviae* ตั้งแต่ 3-12 ชั่วโมง และกลับเข้าสู่ระดับปกติที่ 24 ชั่วโมงหลังจากกิ้งติดเชื้อ นอกจากนี้กิ้งในกลุ่ม *MrToll*-silenced เมื่อ challenge ด้วย *A. caviae* พบว่าจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย (CFU) และอัตราการตายของกิ้งเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ จากผลงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า *MrToll* มีความเกี่ยวข้องกับการป้องกันเชื้อโรคในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อเชื้อ *A. caviae*

Hemocyanin เป็นโปรตีนเชิงซ้อนที่ประกอบด้วยหลายหน่วยย่อยพบใน hemolymph โดยเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน ในการศึกษานี้ได้แยกยีน *hemocyanin* ของกิ้งก่ามกราคมได้สำเร็จและให้ชื่อว่า *MrHC* ยีน *MrHC* มีกรอบการอ่านที่มีความยาว 1,992 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นโปรตีนความยาว 663 หน่วย โดยโปรตีน *MrHC* มีมวลโมเลกุล 76.5 kDa ประกอบด้วยบริเวณต่างๆ ที่เป็นคุณสมบัติของ hemocyanin superfamily ประกอบด้วย hemocyanin-all-alpha domain ความยาว 124 หน่วย, hemocyanin-copper containing domain ความยาว 258 หน่วย และ hemocyanin-immunoglobulin-like domain ความยาว 248 หน่วย จากการวิเคราะห์ ORF ของ *MrHC* พบว่าร้อยละ 99 มีความเหมือน (identity) กับ hemocyanin 2 ของ *Pacifastacus leniusculus*, hemocyanin ของ *Fenneropenaeus chinensis*, hemocyanin ของ *Litopenaeus vannamei* และ hemocyanin

subunit Y ของ *M. japonicus*; ร้อยละ 97 มีความเหมือนกับ hemocyanin subunit L ของ *M. japonicus*; ร้อยละ 96 มีความเหมือนกับ hemocyanin alpha-subunit ของ *Homarus americanus* การวิเคราะห์ phylogenetics พบว่า MrHC มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ hemocyanin ของ กุ้ง *Macrobrachium nipponense*, hemocyanin 2 ของกุ้ง *P. leniusculus* และ hemocyanin alpha-subunit ของกุ้ง *H. americanus* จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *MrHC* หลังจากฉีดเชื้อไวรัส *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*MrNV*) พบว่ายีน *MrHC* มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้น 237 เท่าในวันที่ 2 นอกจากนี้ผลการทดสอบคุณสมบัติการต้านจุลชีพของรีคอมบิแนนท์โปรตีน MrHC บริเวณ immunoglobulin-like domain พบว่าสามารถมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *A. caviae*, *A. veronii*, *A. hydrophila*, *Bacillus cereus* และ *B. megaterium*. จากผลงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า MrHC มีความเกี่ยวข้องกับการป้องกันเชื้อโรคในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อเชื้อแบคทีเรียและไวรัส *MrNV*



*MOLECULAR ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF TOLL RECEPTOR AND
HEMOCYANIN GENES OF MACROBRACHIUM ROSENBERGII*



AN ABSTRACT
BY
CHUTIMA SRISUK

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Doctor of Philosophy Degree of Biotechnology
at Srinakharinwirot University

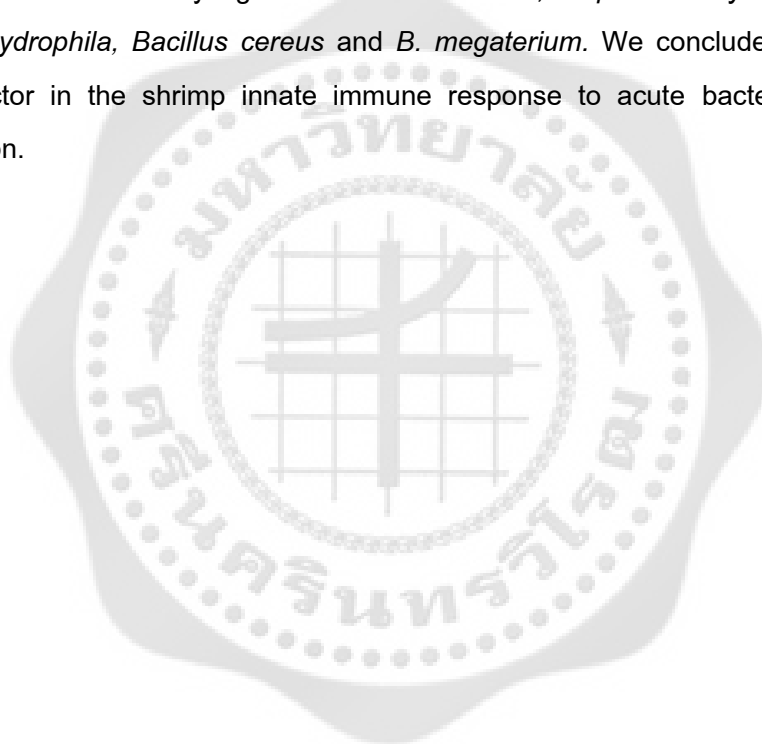
April 2016

Chutima Srisuk. (2016). *Molecular isolation and characterization of Toll receptor and hemocyanin genes of Macrobrachium rosenbergii*. Doctor thesis, Ph.D. (Biotechnology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Assoc. Prof. Dr. Parin Chaivisuthangkura, Asst. Prof. Dr. Siwaporn Longyant, Dr. Saengchan Senapin.

Toll receptors are cell surface molecules acting as pattern recognition receptors (PRRs) that have been implicated in the signaling pathway of innate immune responses. In this study, the full-length cDNA of a Toll receptor gene of *Macrobrachium rosenbergii*, designated *MrToll*, was successfully isolated. The *MrToll* gene sequence contained an open reading frame (ORF) of 2,799 nucleotides encoding a protein of 932 amino acid residues. The protein contained distinct structural motifs of the Toll-like receptor (TLR) family, including an extracellular domain containing 15 leucine-rich repeats (LRRs), a transmembrane segment of 23 amino acids, and a cytoplasmic Toll/interleukin-1R (TIR) domain of 139 residues. Phylogenetic analysis revealed that *MrToll* and Toll receptors of *Marsupenaeus japonicus* (*MjToll*) evolved closely. However, the *MrToll* ORF demonstrated only 48-49% identity with shrimp Toll1, suggesting that *MrToll* isolated from a palaemonid shrimp might belong to a novel class of Toll receptors in shrimp. The transcripts of the *MrToll* gene were constitutively expressed in various tissues, with high levels in hemocytes, the stomach and muscle. A semi-quantitative RT-PCR demonstrated that the expression patterns of *MrToll* were distinctly modulated after *Aeromonas caviae* stimulation, with significant enhancement at 3 to 12 hours post-challenge and a decline to basal levels 24 hours post-challenge. In addition, when *MrToll*-silenced shrimp were challenged with *A. caviae*, there was a significant increase in mortality and bacterial CFU counts. These results suggest that *MrToll* might be involved in host innate defense, especially against the pathogen *A. caviae*.

Hemocyanin is a multi-subunit protein complex found in the hemolymph and involved in the immune system of crustaceans. In this study, a *M. rosenbergii* hemocyanin gene designated *MrHC* was successfully isolated. The *MrHC* gene sequence contained an open reading frame (ORF) of 1,992 nucleotides encoding a protein of 663 amino acid residues. The deduced amino acid sequence with molecular mass of 76.5 kDa contained distinct structural motifs of the hemocyanin superfamily, including a hemocyanin-all-alpha domain containing 124 amino acids, a hemocyanin-copper containing domain of 258 amino acids and a hemocyanin-immunoglobulin-like domain of 248 amino acids. The *MrHC* gene

demonstrated 99% identity with hemocyanin 2 of *Pacifastacus leniusculus*, hemocyanin of *Fenneropenaeus chinensis*, *Litopenaeus vannamei* and hemocyanin subunit Y of *M. japonicus*; 97% identity with hemocyanin subunit L of *M. japonicus*; 96% identity with hemocyanin alpha-subunit of *Homarus americanus*. A phylogenetic tree based on amino acid sequences of hemocyanin was constructed. MrHC was placed in a group that includes hemocyanin of *Macrobrachium nipponense*, hemocyanin 2 of *P. leniusculus* and alpha-subunit of *H. americanus*. For expression analysis after *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) challenge tests, MrHC gene was up-regulated (237-fold at day 2). In part of antimicrobial screening, recombinant protein of immunoglobulin-like domain of MrHC exhibited antibacterial activity against *Vibrio vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *A. caviae*, *A. veronii*, *A. hydrophila*, *Bacillus cereus* and *B. megaterium*. We conclude that MrHC is an important factor in the shrimp innate immune response to acute bacterial infection and MrNV infection.



ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การแยกและศึกษาคุณสมบัติของยีน *Toll receptor* และ *hemocyanin* ของกุ้งก้ามกราม
ของ
ชุตินา ศรีสุข

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....รักษาราชการแทนคณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.ดุขฎิ โยเหลา)
วันที่ เดือน เมษายน พ.ศ. 2559

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ที่ปรึกษาหลักประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร) (ดร. นันทิกา คงเจริญพร)

.....ที่ปรึกษาร่วมกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์) (รองศาสตราจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร)

.....ที่ปรึกษาร่วมกรรมการ
(ดร. แสงจันทร์ เสนาปิ่น) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์)

.....กรรมการ
(ดร. แสงจันทร์ เสนาปิ่น)

.....กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยดีเป็นเพราะผู้วิจัยได้รับคำแนะนำอย่างดียิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร ประธานกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ผู้ช่วย ศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์ และ ดร. แสงจันทร์ เสนาปิ่น กรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล ดร. ประวัติ อังประภาพรชัย และ ดร. ธนวรรณ เตชาทางกูร ผู้คอยตักเตือน สั่งสอน และแนะนำทั้งในด้านวิทยาการ ความรู้และจริยธรรมประกอบการทำปริญญานิพนธ์ที่สมบูรณ์ Professor Dr. William G. Bendena ที่ให้โอกาสข้าพเจ้าทำวิจัยใน Queen's Biology Department, Queen's university ประเทศแคนาดา ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร หน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง (Centex shrimp) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และ Queen's Biology Department, Queen's university ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่าง ๆ ให้ข้าพเจ้าได้ใช้ตลอดระยะเวลาของการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ได้ให้เงินทุนอุดหนุนการศึกษาและการวิจัยครั้งนี้

ขอบคุณพี่ น้องและเพื่อนๆ ในห้องปฏิบัติการโมโนโคเนลแอนติบอดี ห้องปฏิบัติการ อนุชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ห้องปฏิบัติการ Centex shrimp คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ห้องปฏิบัติการ Bendena Lab และ Chin-Sang Lab Queen's Biology Department, Queen's university ที่ให้ความช่วยเหลือและเพื่อน ๆ นมร. สว. 2 ทุกคนให้กำลังใจมาโดยตลอด

ขอบคุณคุณประกอบ ทรัพย์ยอดแก้ว เจ้าของประกอบฟาร์ม จังหวัดราชบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์กักก้ามกรามในการวิจัย

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคุณบิดา มารดา คุณย่าและคุณอาทุกท่านที่ให้การสนับสนุน รวมทั้งเป็นกำลังใจตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาและวิจัย

ท้ายที่สุดนี้ข้าพเจ้าขอณาเอาผลประโยชน์อันเกิดจากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ทั้งหมดมอบ เป็นกุศลแก่กัณฐก้ามกรามทุกตัว ที่ได้สละชีวิตเพื่อการทำปริญญานิพนธ์ของข้าพเจ้า

ชุตีมา ศรีสุข

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย
จาก
โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย	4
ความสำคัญของการวิจัย.....	4
ขอบเขตของการวิจัย.....	4
สมมติฐานในการวิจัย.....	5
ผลที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย.....	5
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	35
อุปกรณ์และสารเคมี.....	35
วิธีดำเนินการทดลอง.....	40
4 ผลการทดลอง.....	77
การแยกยีนและศึกษาคุณสมบัติของ MrToll.....	77
การแยกยีนและศึกษาคุณสมบัติของ MrHC.....	104
5 สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ.....	126
การศึกษาคูณสมบัติของ MrToll.....	126
การศึกษาคูณสมบัติของ MrHC.....	130
บรรณานุกรม.....	133
ภาคผนวก.....	147
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	150

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	35
2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง	36
3 ชนิดของพลาสติกที่ใช้ในการทดลอง	37
4 ลำดับดีเอ็นเอของ primer ที่ใช้ในการทดลองจากบริษัท 1 st Base	38
5 ส่วนผสมของการสังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอ gill และ hepatopancreas ของกุ้งก้ามกราม.....	41
6 ส่วนผสมของการสังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอ gill และ hepatopancreas ของกุ้งก้ามกราม (ต่อ).....	41
7 ส่วนผสมของการทำ PCR เพื่อหาลำดับดีเอ็นเอของยีน <i>MrToll</i>	43
8 ส่วนผสมของการทำ ligation ของผลผลิต PCR กับ pCR 2.1 vector	44
9 ส่วนผสมของการตัดผลผลิต PCR ที่โคลนอยู่ใน pCR 2.1 vector ด้วย <i>EcoRI</i> -HF TM	47
10 ส่วนผสมของการสังเคราะห์ cDNA เส้นแรกทางปลาย 5'	49
11 ส่วนผสมของการสังเคราะห์ cDNA เส้นแรกทางปลาย 5'(ต่อ)	49
12 ส่วนผสมของการทำปฏิกิริยา 5'-RACE PCR ยีน <i>MrToll</i>	51
13 ส่วนผสมของการทำปฏิกิริยา nested 5'-RACE PCR ยีน <i>MrToll</i>	52
14 ส่วนผสมของการทำ RT-PCR จากอาร์เอ็นเอวัยต่างๆ ของกุ้งก้ามกราม	56
15 ส่วนผสมของการทำ ligation ของผลผลิต PCR กับ pGEM-T Easy vector	59
16 ส่วนผสมของการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy - TIR domain ด้วย <i>PstI</i>	60
17 ส่วนผสมของการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดสาย sense และ antisense ด้วย <i>SacI</i>	62
18 ส่วนผสมของ <i>In vitro</i> transcription สาย sense และ antisense	62
19 ส่วนผสมของการย่อยสลาย linearized DNA สาย sense และ antisense	63
20 ส่วนผสมของการย่อยสลายดีเอ็นเอ.....	64
21 ส่วนผสมของการย่อยสลายอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว	65
22 ส่วนผสมของการย่อยสลายอาร์เอ็นเอสายคู่	65
23 ส่วนผสมของการสังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอ muscle ของกุ้งก้ามกราม	69
24 ส่วนผสมของการสังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอ muscle ของกุ้งก้ามกราม (ต่อ).....	70
25 ส่วนผสมของการทำ qPCR	71
26 แสดงคุณสมบัติของโปรตีน MrHC-C ในการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย โดยดูจากการเกิด clear zone (mean $\pm$ SD, n=3)	121

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 กุ้งก้ามกราม (<i>M. rosenbergii</i>)	7
2 แสดงโครงสร้างและความแตกต่างของ Toll และTLR.....	14
3 โครงสร้างปฐภูมิ ทดียบภูมิ และ ตติยภูมิ ของ leucine-rich repeat (LRR)	15
4 โครงสร้างแบบตติยภูมิของ hemocyanin หน่วยย่อยที่ 2 จาก <i>L. polyhemus</i>	22
5 กระบวนการทำงานของ RNAi.....	29
6 เทคนิค 5' RACE.....	32
7 เทคนิค 3' RACE.....	33
8 โครงสร้างของ pCR 2.1 vector และตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ต่างๆ.....	45
9 โครงสร้างของ pGEM-T Easy vector และตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ต่างๆ.....	61
10 โครงสร้างของ pQE-30 vector และตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ต่างๆ.....	74
11 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ Toll receptor ในกุ้ง.....	78
12 ผลผลิต PCR ของ MrToll.....	79
13 การโคลนและการหาลำดับ cDNA บางส่วนที่มีความยาวมากขึ้นของยีน <i>MrToll</i>	80
14 ผลการสังเคราะห์ 5'-RACE ของ <i>MrToll</i>	82
15 ผลการสังเคราะห์ 3'-RACE ของ <i>MrToll</i>	83
16 ภาพแสดงลำดับ cDNA และลำดับกรดอะมิโนของ MrToll	86
17 ลำดับกรดอะมิโนบริเวณ LRR ของ MrToll	89
18 การวิเคราะห์ความเหมือนของกรดอะมิโนของ (amino acid identity) ของ ORF และ ectodomain ของ MrToll เปรียบเทียบกับ Toll ของกุ้งชนิดต่างๆ	89
19 ภาพแสดงผลการ alignment โดยใช้บริเวณ TIR domain ของกุ้งก้ามกราม เปรียบเทียบกับ TIR domain ของกุ้งชนิดอื่นๆ พบว่า TIR domain จะมีบริเวณอนุรักษ์ที่มีกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน แอสปาร์ติก อะลานีน (FDA) โปรลีน (P) และฟีนิลอะลานีน ทริปโตเฟน (FW)	90
20 ภาพจำลองแสดงโครงสร้างของโปรตีน MrToll	91
21 ภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ MrToll	92
22 ผลผลิต PCR จากการทำ RT-PCR เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน <i>MrToll</i>	93
23 ผลผลิต PCR ขนาด 200 bp ของยีน <i>MrToll</i> และกราฟแสดงการแสดงออก ของยีน <i>MrToll</i> ใน hemocyte ของกุ้งก้ามกรามในกลุ่มต่างๆ ที่เวลาแตกต่างกัน.....	95
24 ผลผลิต PCR ขนาด 237 bp แสดงการติดเชื้อ <i>A. caviae</i> ในกุ้งที่เวลาต่างๆ หลังจากฉีดด้วย <i>A. caviae</i>	96

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
25 การสังเคราะห์ผลผลิต PCR และการวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์พลาสมิดสาย sense และ สาย antisense เพื่อนำไปผลิตอาร์เอ็นเอสายคู่	97
26 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดสาย sense และ antisense สำหรับใช้เป็นต้นแบบ ในปฏิกิริยา <i>In vitro</i> transcription.....	98
27 การตรวจสอบความเป็นอาร์เอ็นเอสายคู่.....	99
28 การแสดงออกของยีน <i>MrToll</i> ใน muscle กู้ก้ำมกรามที่เวลาต่างๆ หลังจากถูก knock-down ด้วยวิธี dsRNA-mediated RNA interference	100
29 กราฟแสดงอัตราการตายของกิ้งก่ามกรามหลังจากถูกฉีดด้วย dsRNA-Toll, dsRNA-IMNV และ 2XPBS จากนั้นแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุม.....	102
30 กราฟแสดงจำนวนแบคทีเรียในน้ำเลือดกิ้งก่ามกรามหลังจากถูกฉีดด้วย dsRNA-Toll, dsRNA-IMNV และ 2XPBS	103
31 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ hemocyanin ในกิ้ง.....	104
32 ผลผลิต PCR ของ <i>MrHC</i>	105
33 การวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCR 2.1-MrHC.....	106
34 ผลการสังเคราะห์ 5'-RACE ของ <i>MrHC</i>	107
35 ผลการสังเคราะห์ 3'-RACE ของ <i>MrHC</i>	108
36 ภาพแสดงลำดับ cDNA และลำดับกรดอะมิโนของ <i>MrHC</i>	110
37 ภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ <i>MrHC</i>	112
38 ผลผลิต PCR จากการทำ RT-PCR เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน <i>MrHC</i>	113
39 ผลผลิต PCR ของ <i>MrHC</i> และ β -actin.....	115
40 quantitative real-time PCR แสดงระดับการแสดงออกของยีน <i>MrHC</i> ของกิ้งที่ถูกฉีดเชื้อ <i>MrNV</i> และกิ้งปกติ ที่เวลาต่างๆ กัน	116
41 ผลผลิต PCR แสดงการติดเชื้อไวรัส <i>MrNV</i> ในกิ้งที่เวลาต่างๆ หลังจากฉีดด้วย <i>MrNV</i> โดยกิ้งที่ติดเชื้อไวรัสพบผลผลิต PCR ขนาด 1,041 bp	117
42 ผลผลิต PCR ของ <i>MrHC</i> -C และการวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pQE-30- <i>MrHC</i> -C.....	118
43 การตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน <i>MrHC</i> -C	119

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ

หน้า

- 44 การทดสอบคุณสมบัติของโปรตีน MrHC-C ในการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย
แกรมบวก *B. subtilis* (A), *B. cereus* ATCC 11787 (B), *B. megaterium* (C)
และ *S. aureus* ATCC 25923 (D).....122
- 45 การทดสอบคุณสมบัติของโปรตีน MrHC-C ในการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย
แกรมลบ *V. vulnificus* DMST 27426 (A), *V. harveyi* DMST 1526 (B),
V. mimicus DMST 27430 (C) และ *V. parahaemolyticus* DMST 22093 (D)123
- 46 การทดสอบคุณสมบัติของโปรตีน MrHC-C ในการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย
แกรมลบ *A. caviae* AHHRI 06103 (A), *A. veronii* DMST 21255 (B) และ
A. hydrophila DMST 22095 (C)124
- 47 การทดสอบคุณสมบัติของโปรตีน MrHC-C ในการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย
แกรมลบ *E. coli* ATCC 25922 (A) และ *E. coli* สายพันธุ์ M15 ที่มี
รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pQE30-MrHC-C (B)125

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

กุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* เป็นกุ้งน้ำจืดที่สำคัญของภูมิภาคเอเชียใต้ ปัจจุบันกุ้งก้ามกรามเป็นสายพันธุ์หนึ่งที่มีความสนใจเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ โดยประเทศอินเดียและบังคลาเทศ ได้เริ่มผลิตเพื่อส่งออกอย่างเป็นรูปธรรม สำหรับในประเทศไทย เริ่มมีผู้สนใจในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามมากขึ้นตั้งแต่ปี พ.ศ. 2520 (New. 2010) และมีการเริ่มตั้งธุรกิจผลิตเชิงพัฒนาการเพื่อการส่งออกบ้างแล้ว โดยเกษตรกรสามารถผลิตกุ้งก้ามกรามได้เพิ่มขึ้นจากประมาณ 400 ตันในปี พ.ศ. 2523 เป็นมากกว่า 30,000 ตันในปี พ.ศ. 2551 (กรมประมง ปี พ.ศ. 2553) (Uthairat; & Orapint. 2012: 1015-1022) ปัจจุบันมีการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในจังหวัดต่าง ๆ แถบภาคกลางของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดสุพรรณบุรี กาญจนบุรี นครปฐม ราชบุรี อย่างไรก็ตามอุตสาหกรรมเลี้ยงกุ้งก้ามกรามนั้นอาจประสบปัญหาและอุปสรรคต่าง ๆ ระหว่างการอนุบาลกุ้ง เช่น คุณสมบัติของน้ำในระหว่างการอนุบาลกุ้งก้ามกราม การให้อาหาร ความสกปรกของโรงเพาะฟัก โรคกุ้งซึ่งอาจเกิดจากสภาพแวดล้อมในบ่อเพาะฟักไม่เหมาะสม หรือเชื้อโรคต่าง ๆ ได้แก่ เชื้อโรคในกลุ่มโปรโตซัว เช่น *Zoothamnium* sp., *Epistylis* sp., *Vorticella* sp., *Acienta* sp., *Tokophrya* sp. กลุ่มแบคทีเรีย เช่น *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp. กลุ่มเชื้อรา เช่น *Liginidium* sp., *Fusarium* sp. กลุ่มไวรัส เช่น *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) และ extra small virus (XSV) เป็นต้น (แหล่งเรียนรู้ทางด้านประมง. 2555: ออนไลน์) โดยในกรณีของการติดเชื้อ MrNV และ XSV พบว่าลูกกุ้งที่ติดเชื้อจะมีอัตราการตายสูงกว่ากุ้งก้ามกรามเต็มวัย (Bonami; et al. 2005: 23–31)

การระบาดของโรคติดเชื้อในกุ้งส่งผลให้อัตราการตายเพิ่มสูงขึ้นและส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก การวิจัยความรู้พื้นฐานในด้านชีววิทยาของกุ้งในเรื่องระบบภูมิคุ้มกันจะนำไปสู่การปรับปรุงระบบการเลี้ยงกุ้งให้เป็นไปอย่างยั่งยืน และมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยที่สุด ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงให้ความสนใจและพยายามทำความเข้าใจเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งมีความสำคัญในการควบคุมการเกิดโรค และอาศัยความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับยีนและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบนี้

ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งสามารถแบ่งได้เป็น 2 ระบบ คือ ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ โดยเซลล์เม็ดเลือด (hemocyte) จับกินจุลินทรีย์ที่มากบุกรุกโดยวิธีฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) การเกิดโนดูล (nodule formation) และการโอบล้อมสิ่งแปลกปลอม (encapsulation) อีกระบบคือระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด โดยอาศัยเอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) ซึ่งจะทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก, ระบบโปรเฟโนลออกซิเดส (prophenol oxidase ; proPO) เป็นกลไกการป้องกันที่

เกี่ยวกับการสังเคราะห์ phenol oxidase และการสังเคราะห์เมลานิน (melanin) ซึ่งจะช่วยป้องกันและยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Söderhäll; & Cerenius. 1998: 23-28)

ในปัจจุบันมีการศึกษาหน้าที่ของยีนหลายๆ ยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง เช่น *Toll receptor* และ *hemocyanin* ในกุ้งชนิดต่างๆ แต่พบว่ามีรายงานไม่มากนัก สำหรับ *Toll receptor* นั้นจัดอยู่ในตระกูล pattern recognition receptor (PRR) ซึ่งมีวิวัฒนาการมายาวนานและมีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในการป้องกันการบุกรุกของเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย โดยจับกับ pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) จากการศึกษาในกุ้งหลายชนิด พบการแสดงออกของ *Toll receptor* ในอวัยวะต่างๆ เช่น gill, hemocyte, heart, brain, stomach, intestine, lymphoid organ และ hepatopancreas ปัจจุบัน *Toll receptor* มีรายงานการศึกษาในกุ้งหลายชนิด เช่น *Litopenaeus vannamei* โดยพบว่า *Toll receptor* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อกุ้งติดเชื้อ *Vibrio harveyi* (Wang; et al. 2010: 49–58) สำหรับการศึกษาในกุ้ง *Penaeus monodon* เมื่อทำให้ติดเชื้อ white spot syndrome virus (WSSV) พบว่าการแสดงออกของ *Toll receptor* ไม่แตกต่างจากกุ้งปกติ (Joop; et al. 2007: 504-513) อย่างไรก็ตามการศึกษาในกุ้ง *Marsupenaeus japonicus* พบการแสดงออกของ *Toll receptor* เพิ่มขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วย peptidoglycan (Mekata; et al. 2008: 122–133) และในกรณีของ *Fenneropenaeus chinensis* พบการแสดงออกของ *Toll receptor* เพิ่มขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อ *Vibrio anguillarum* (Yang; et al. 2008: 564–574)

สำหรับ *hemocyanin* เป็นโปรตีนเชิงซ้อนที่ประกอบด้วยหลายหน่วยย่อยโดยมี Cu^{2+} จับกับโมเลกุลของโปรตีน พบเป็นส่วนประกอบหลักประมาณร้อยละ 90-95 ใน hemolymph ซึ่งพบได้ในสัตว์กลุ่มมอลลัส (mollusk) และอาร์โทรพอด (arthropod) (Adachi; et al. 2005: 136-143, Van Holde; & Miller. 1995: 1-81, Sellos; Lemoine; & Wormhoudt. 1997: 153-158) *hemocyanin* มีบทบาทหลายอย่าง เช่น ขนส่งออกซิเจน (Van Holde; & Miller. 1995: 1-81) ขนส่งฮอร์โมน ecdysone ที่เกี่ยวกับการลอกคราบ (Jaenicke; Föll; & Decker 1999: 34267-34271) และมีการศึกษาพบว่าสายโพลีเปปไทด์ด้านปลาย C ของ *hemocyanin* มีความสามารถในการต้านเชื้อราได้ (Destoumieux; et al. 2000: 461-469) *hemocyanin* ถูกกระตุ้นให้มีแอกติวิตีหรือเปลี่ยนเป็น phenol oxidase ใน hemolymph ได้ (Adachi; et al. 2001: 1130-1136, Lee; Lee; & Söderhäll. 2004: 490-496) จากคุณสมบัติของ phenol oxidase มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองของครัสเตเชียน บ่งชี้ว่า *hemocyanin* น่าจะเป็นโปรตีนที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองของครัสเตเชียนเช่นกันและจากการศึกษาในกุ้งชนิดต่างๆ เช่น *P. monodon* และ *P. japonicus* พบว่า *hemocyanin* มีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อไวรัส (non-specific antiviral properties) (Rattanarojpong; et al. 2007: 3809–3814, Pan; et al. 2005: 103–112) โดยพบว่ากุ้งที่ติดเชื้อไวรัสจะมีการแสดงออกของ *hemocyanin* สูงขึ้น

สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับการกำจัดไวรัสออกจากตัวกุ้งก้ามกรามและการเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ต่างๆ ในระบบภูมิคุ้มกัน ในปี 2008 Sarathi และคนอื่นๆ พบว่ากุ้งก้ามกรามโตเต็มวัยสามารถกำจัดไวรัส WSSV ออกจากร่างกายได้ (Sarathi; et al. 2008: 222-230) ต่อมาในปี 2010 Ravi และคนอื่นๆ ทดลองนำกุ้งก้ามกรามโตเต็มวัยมาทำให้ติดเชื้อไวรัส MNV และ XSV พบว่ากุ้งก้ามกรามสามารถกำจัดไวรัสทั้งสองออกจากร่างกายได้เช่นเดียวกัน และเมื่อศึกษาพารามิเตอร์ของระบบภูมิคุ้มกันต่างๆ ในกุ้งที่ติดเชื้อ เช่น proPO, superoxide anion, superoxide dismutase (SOD), total hemocyte count (THC), clotting time และ hemocyanin พบว่า มีการแสดงออกที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในบางพารามิเตอร์ในช่วงวันแรกๆ ของการติดเชื้อและกลับมาแสดงออกปกติในช่วงต่อมา (Ravi; et al. 2010: 428–433) แต่กลไกการกำจัดเชื้อดังกล่าวยังไม่มีผู้ศึกษาไว้

จากที่กล่าวมาข้างต้นจึงเป็นที่น่าสนใจว่ากลไกของระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกรามในการกำจัดเชื้อต่างๆ เป็นอย่างไร การวิจัยนี้จึงเริ่มศึกษาเกี่ยวกับยีนและหน้าที่ของโปรตีน Toll receptor และ hemocyanin ในกุ้งก้ามกราม ซึ่งการศึกษานี้เป็นการศึกษาวิจัยแรกของยีนทั้งสองในกุ้งก้ามกราม และคาดว่าจะการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกและหน้าที่ของยีนทั้งสองโดยใช้เทคนิคต่างๆ จะช่วยให้เข้าใจถึงบทบาทและหน้าที่ของ Toll receptor และ hemocyanin ในกุ้งก้ามกรามได้ดียิ่งขึ้น อันจะนำไปสู่การป้องกันการติดเชื้อต่าง ๆ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในอนาคต

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อแยกและศึกษาองค์ประกอบของยีน *Toll receptor* และ *hemocyanin* ของกุ้งก้ามกราม
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ *Toll receptor* และ *hemocyanin* ของกุ้งก้ามกราม
3. เพื่อศึกษาหน้าที่และการแสดงออกของ *Toll receptor* ในอวัยวะต่างๆ ของกุ้งก้ามกรามปกติและกุ้งก้ามกรามที่ทำให้ติดเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas caviae*
4. เพื่อศึกษาหน้าที่และการแสดงออกของ *hemocyanin* ในอวัยวะต่างๆ ของกุ้งก้ามกรามปกติและกุ้งก้ามกรามที่ทำให้ติดเชื้อไวรัส *MnV*
5. เพื่อศึกษาหน้าที่ของ *Toll receptor* โดยใช้กระบวนการ RNA interference (RNAi)
6. เพื่อศึกษาคุณสมบัติการต้านแบคทีเรียของ *hemocyanin*

ความสำคัญของการวิจัย

การศึกษาวิจัยนี้เป็นการศึกษาวิจัยแรกของยีนทั้งสองในกุ้งก้ามกรามและคาดว่าจะการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกและหน้าที่ของยีนทั้งสองโดยใช้เทคนิคต่างๆ จะช่วยให้เข้าใจถึงบทบาทและหน้าที่ของ *Toll receptor* และ *hemocyanin* ในกุ้งก้ามกรามได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งน่าจะนำไปสู่ความเข้าใจด้านระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งก้ามกราม อันจะนำไปประโยชน์มาสู่อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในอนาคต

ขอบเขตของการวิจัย

1. ทำการแยกยีน *Toll receptor* และ *hemocyanin* ของกุ้งก้ามกราม โดยใช้ degenerate primers และ วิธี rapid amplification of cDNA ends (RACE) จากนั้นวิเคราะห์บริเวณ conserved domain และองค์ประกอบต่างๆ ของยีนทั้งสอง
2. ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ *Toll receptor* และ *hemocyanin* เทียบกับกุ้งชนิดอื่นๆ หรือในสัตว์มีกระดูกสันหลัง โดยใช้ข้อมูลจาก amino acid sequence ในการสร้าง phylogenetic tree
3. ศึกษาการแสดงออกของยีน *Toll receptor* ในกุ้งก้ามกรามปกติและกุ้งก้ามกรามที่ challenge ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยวิธี RT-PCR
4. ศึกษาการแสดงออกของยีน *hemocyanin* ในกุ้งก้ามกรามปกติและกุ้งก้ามกรามที่ challenge ด้วยเชื้อไวรัส *MnV* ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยวิธี quantitative real-time PCR (qPCR)
5. ศึกษาหน้าที่ของ *Toll receptor* โดยกระบวนการ RNA interference (RNAi) เพื่อดูการตอบสนองต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย หากไม่มี *Toll receptor* ในกุ้งก้ามกราม
6. ศึกษาคุณสมบัติการต้านแบคทีเรียชนิดต่างๆ ของรีคอมบิแนนท์ฮีโมไซยานินบริเวณปลาย C (Ig-like domain)

สมมติฐานการวิจัย

1. การแสดงออกของยีน *Toll receptor* อาจเพิ่มสูงขึ้นหลังจากที่กุ้งติดเชื้อแบคทีเรีย การยับยั้งการแสดงออกของยีน *Toll receptor* อาจส่งผลให้กุ้งมีอัตราการตายเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับกุ้งที่ไม่ได้ถูกยับยั้ง ภายหลังการ challenge ด้วย *A. caviae*
2. การแสดงออกของยีน *hemocyanin* อาจเพิ่มสูงขึ้นหลังจากที่กุ้งติดเชื้อไวรัส และ บริเวณปลาย C ของ *hemocyanin* น่าจะมีคุณสมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรีย

ผลที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัยนี้

1. สามารถแยกยีนและวิเคราะห์บริเวณ conserved domain และองค์ประกอบต่างๆ ของ *Toll receptor* และ *hemocyanin* ของกุ้งก้ามกรามได้
2. ทราบความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในระดับโมเลกุลของ *Toll receptor* และ *hemocyanin* เทียบกับโปรตีนทั้งสองในกุ้งชนิดอื่นๆ หรือในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่นๆ
3. สามารถศึกษาการแสดงออกของยีน *Toll receptor* ในกุ้งก้ามกรามปกติและกุ้งก้ามกรามที่ challenge ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* ที่ระยะเวลาต่างๆ ได้
4. สามารถใช้เทคโนโลยี RNAi ในการศึกษาหน้าที่ของ *Toll receptor* เพื่อดูการตอบสนองต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae*
5. ทราบการแสดงออกของ *hemocyanin* โดยวิธี quantitative real-time PCR (qPCR) เพื่อดูการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสในกุ้งก้ามกราม
6. ทราบถึงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียจากบริเวณปลาย C ของ *hemocyanin*

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*)

ลักษณะของโดยทั่วไปของกุ้งก้ามกราม

กุ้งก้ามกราม (ชื่อวิทยาศาสตร์: *Macrobrachium rosenbergii*; ชื่อสามัญ giant freshwater prawn) เป็นกุ้งน้ำจืดขนาดใหญ่ อยู่ในวงศ์ Palaemonidae มีชื่อเรียกที่ต่างออกไปมากมาย เช่น "กุ้งแม่น้ำ", "กุ้งหลวง" ขณะที่กุ้งตัวเมียที่มีขนาดลำตัวเล็กกว่า เรียก "กุ้งนาง" กุ้งก้ามกรามมีเปลือกสีเขียวอมฟ้าหรือม่วง ก้ามยาวสีม่วงเข้ม ตลอดทั้งก้ามมีปุ่มตะปุ่มตะป่ำ (ภาพประกอบ 1) ตามธรรมชาติอาศัยในแม่น้ำ ลำคลอง พบได้แทบทุกจังหวัดในภาคกลางและภาคใต้ ทั้งในน้ำจืดและน้ำกร่อย วางไข่ในน้ำกร่อยที่เค็มจัด อาหารของกุ้งก้ามกราม ได้แก่ ไร้เดือน ตัวอ่อนของลูกน้ำ ลูกไร้ ลูกปลาขนาดเล็ก ซากของสัตว์ต่างๆ และในบางโอกาaskก็กินพวกเดียวกันเอง พบชุกชุมทำให้จับง่าย โดยเฉพาะในฤดูหนาว ด้วยสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไปในปัจจุบัน ทำให้ปริมาณในธรรมชาติลดน้อยลง เมื่อมีการพัฒนาเทคโนโลยีการผสมพันธุ์กุ้ง ประเทศไทยจึงเริ่มมีการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามตั้งแต่ปี พ.ศ. 2520 (New, 2010) ตั้งแต่นั้นมาเกษตรกรสามารถผลิตกุ้งก้ามกรามได้เพิ่มขึ้นจากประมาณ 400 ตันในปี พ.ศ. 2523 เป็นมากกว่า 30,000 ตันในปี พ.ศ. 2551 (กรมประมง, 2553) (Uthairat; & Orapint, 2012: 1015-1022) จากการที่กุ้งก้ามกรามเป็นที่ต้องการของตลาด จึงมีราคาสูงและกุ้งก้ามกรามตามธรรมชาติมีปริมาณน้อย ปัจจุบันจึงมีการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในทุกภาคของประเทศ โดยพื้นที่ภาคกลางจะเป็นแหล่งเพาะพันธุ์กุ้งก้ามกรามที่สำคัญ เนื่องจากเป็นพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์ และมีแหล่งน้ำที่มีความเหมาะสม จังหวัดที่มีการเพาะเลี้ยงมากที่สุดคือ จังหวัดสุพรรณบุรี นครปฐม และราชบุรี ส่วนภาคตะวันออกเฉียงเหนือเพาะเลี้ยงที่จังหวัดกาฬสินธุ์ ร้อยเอ็ด ภาคเหนือเพาะเลี้ยงที่จังหวัดเชียงราย ปริมาณการผลิตกุ้งก้ามกรามส่วนใหญ่มาจากการเพาะเลี้ยงถึงร้อยละ 88 (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2554: 1)

อนุกรมวิธานของกุ้งก้ามกราม

Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Order Decapoda

Suborder Natantia

Family Palaemonidae

Genus *Macrobrachium*

Species *rosenbergii*



ภาพประกอบ 1 กุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*)

ที่มา: Michael, B. N. (2002). Farming freshwater prawns. A manual for the culture of the giant river prawn *Macrobrachium rosenbergii*. p.8.

การผสมพันธุ์วางไข่

กุ้งก้ามกรามสามารถผสมพันธุ์และวางไข่ได้ตลอดปี การผสมพันธุ์จะเกิดเมื่อตัวเมียลอกคราบและจะปล่อยฟีโรโมนดึงดูดตัวผู้ให้เข้าหาเพื่อผสมพันธุ์ในขณะที่เปลือกยังอ่อนอยู่ ตัวผู้จะเข้าผสมโดยให้น้ำเชื้อตัวผู้ซึ่งมีลักษณะคล้ายสารเหนียวไปติดอยู่กับส่วนหน้าอกระหว่างขาเดินของตัวเมีย หลังจากผสมพันธุ์แล้ว 6-10 ชั่วโมง กุ้งก้ามกรามตัวเมียจะเริ่มวางไข่ ตัวเมียจะวางไข่บริเวณหน้าท้องระหว่างขาว่ายน้ำ โดยขาว่ายน้ำจะทำหน้าที่โบกพัดน้ำให้ไหลผ่านเพื่อเพิ่มออกซิเจนให้แก่ไข่ ปกติแล้วกุ้งตัวเมียน้ำหนัก 80 กรัม สามารถผลิตไข่ได้ประมาณ 80,000 ถึง 100,000 ฟอง/ตัว ไข่ที่ติดขาว่ายน้ำในระยะแรกๆ มีสีเหลืองอมส้มมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6-0.8 มิลลิเมตร มีรายงานว่างไข่มีการพัฒนาไปจนมีอวัยวะครบทุกส่วนภายในเปลือกไข่ ขณะเดียวกันถ้าสังเกตจากรายนอกจะเห็นสีของไข่เปลี่ยนแปลงไปจนกระทั่งระยะสุดท้ายเปลี่ยนเป็นสีเทาดำ และรูปร่างของกุ้งพียงอภายในเปลือกไข่สามารถมองเห็นด้วยตาได้ชัดเจน ตัวเมียที่อยู่ในวัยเจริญพันธุ์สามารถวางไข่ได้ 2 ครั้ง ในระยะ 5 เดือน ดังนั้นใน 1 ปี กุ้งก้ามกรามอาจวางไข่ได้ถึง 3-4 ครั้ง ไข่ที่ผสมแล้วจะฟักภายใน 19-20 วัน ที่อุณหภูมิ 26-28 องศาเซลเซียส ลูกกุ้งที่ฟักใหม่ๆ ในระยะกุ้งวัยอ่อน เป็นพวกที่ชอบแสงมักว่ายน้ำไปข้างหลังในท่าตึงลำเงี่ยงคล้ายลูกยุง (Michael. 2002)

การพัฒนาและการเจริญเติบโตของตัวอ่อน

หลังจากไข่ได้รับการผสมจากเชื้อตัวผู้แล้วจะมีการแบ่งตัวของเซลล์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนเป็นอวัยวะต่างๆ เกือบสมบูรณ์ แล้วจึงฟักออกจากไข่ ใช้ระยะเวลาประมาณ 19 วัน ยังมีลักษณะไม่เหมือนพ่อแม่ ล่องลอยไปตามกระแสน้ำ จากนั้นจะเจริญเติบโตด้วยการลอกคราบอีก 12 ครั้ง จึงจะมีลักษณะเหมือนพ่อแม่ การลอกคราบแต่ละครั้งจะใช้เวลา 1-5 วัน ซึ่งจะมีรูปร่างเปลี่ยนไปทุกครั้ง จนถึงระยะสุดท้ายที่เรียกว่า ตัวอ่อนวัยสุดท้าย (post larva) ลูกกุ้งจะมีลักษณะเหมือนพ่อแม่ทุกประการ ลำตัวใส สามารถควบคุมการทรงตัวในการว่ายน้ำได้ และจะเกาะอยู่พื้นหรือขอบบ่อ (Fisheries and aquaculture department. 2002)

ระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน

สัตว์กลุ่มครัสเตเชียน เช่น กุ้ง (shrimp) กั้ง (mantis shrimp) และปู (crab) เป็นสัตว์ที่มีเปลือกนอกแข็งและไม่มีกระดูกสันหลัง จึงต้องมีระบบป้องกันตัวที่มีประสิทธิภาพ เพื่อไม่ให้เชื้อโรคเข้ามาบุกรุกทำลายอวัยวะต่างๆ ของร่างกายในขณะที่เกิดบาดแผลหรือในช่วงที่มีการลอกคราบ ระบบภูมิคุ้มกันของครัสเตเชียนจัดเป็นภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) โดยแบ่งออกเป็น 2 ระบบคือ ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (cellular immunity system) และระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (humoral immunity system) (Flegel; & Sritunyalucksana. 2011: 587–607)

ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์

ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์มักใช้ hemocyte กลืนกินจุลินทรีย์ที่เข้ามาบุกรุกโดยวิธี phagocytosis, nodule formation, apoptosis และ encapsulation (จริพร. 2546, Iwanaga; & Lee. 2005: 128–150) โดย hemocyte ชนิดต่างๆ จะทำหน้าที่แตกต่างกัน เช่น phagocytosis จะเกิดขึ้นจากการทำงานของ hyaline cells ซึ่งจัดเป็นด่านแรกในการป้องกันการบุกรุกของเชื้อจุลินทรีย์ไม่ให้ผ่านเข้าสู่ร่างกาย โดยจะกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดเล็กและมีจำนวนไม่มากนัก เช่น โปรโตซัว แบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัสที่บุกรุกผ่านชั้นผิวปกคลุมเข้าสู่ตัวกุ้ง โดย hyaline cells จะยื่น cytoplasm ไปโอบล้อมจุลินทรีย์ จากนั้น lysosome จะหลั่งสารต้านแบคทีเรียและ hydrolytic enzyme หลังจากนั้นจึงปล่อยส่วนที่ถูกย่อยสลายแล้วออกสู่เซลล์ สำหรับ nodule formation จะเกิดเมื่อมีเชื้อโรคเป็นจำนวนมาก โดยการนำสิ่งแปลกปลอมเข้ามาตรงกลางเซลล์ hemocyte หลายๆ เซลล์ ส่วน encapsulation โดย semigranular cells จะเกิดเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมขนาดใหญ่ เช่น ปรสิต (เอื้อมมณัส. 2545)

ชนิดของเม็ดเลือดกึ่งมีตัวด้วยกัน 3 ชนิด คือ

1. agranulocyte หรือ hyalin cell เป็น hemocyte ที่มีรูปร่างแบน กลม ผิวเรียบ บางครั้งพบว่ามีลักษณะคล้ายกระสวย มีนิวเคลียสขนาดใหญ่อยู่กลางเซลล์ มี cytoplasm น้อย พบกรานูลภายในเซลล์น้อยหรือไม่พบเลย เป็น hemocyte ที่มีขนาดเล็กที่สุด ขนาดของเซลล์ยาว 6.8-13.6 ไมครอน กว้าง 6.4-8.3 ไมครอน เส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 ไมครอน เซลล์ชนิดนี้สามารถทำลายสิ่งแปลกปลอมในร่างกายของกิ้งโดย phagocytosis (Kondo; et al. 1998: 421-427)

2. semigranular hemocyte เป็น hemocyte ที่พบลักษณะของเม็ดกรานูลขนาดเล็ก อยู่ในเซลล์ในปริมาณที่ไม่มาก มีรูปร่างหลายแบบคือ รูปร่างกลม รูปไข่ รูปกระสวย เซลล์มีขนาดความยาว 9.0-14.2 ไมครอน กว้าง 4.2-6.8 ไมครอน เส้นผ่านศูนย์กลาง 7-10 ไมครอน เซลล์ชนิดนี้จะทำหน้าที่จดจำและตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายโดยการย่อยสารที่อยู่ในกรานูลและจับสิ่งแปลกปลอมโดยการเกิด nodule formation (Söderhäll; & Cerenius. 1998: 23-28)

3. granulocyte หรือ large granular hemocyte เป็น hemocyte ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด และมี กรานูลขนาดใหญ่จำนวนมากอยู่ใน cytoplasm เซลล์มีขนาดความยาว 12.2-14.6 ไมครอน กว้าง 7.2-7.8 ไมครอน เส้นผ่านศูนย์กลาง 8-10 ไมครอน มีหน้าที่หลักในการกระตุ้นระบบ proPO โดยเป็นแหล่งเก็บเอนไซม์ prophenol oxidase ที่อยู่ใน cytoplasm (Johansson; & Söderhäll. 1989: 171-176)

ระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด

นอกจากการทำงานของเม็ดเลือดในการกำจัดทำลายสิ่งแปลกปลอมแล้ว น้ำเลือดของกิ้ง ยังมีสารประกอบทางชีวเคมี ที่มีพิษต่อเชื้อก่อโรคอีกหลายชนิด สารชีวเคมีเหล่านี้เรียกรวมกันว่า สารน้ำ (humoral defenses) ได้แก่ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (antibacterial activity), แอคกลูตินิน (agglutinin), สารคล้ายไซโตไคน์ (cytokine-like), โมดูเลเตอร์ (modulator), เลคติน (lectin), ไลโซไซม์ (lysozyme) และสารที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด (clotting factor) เป็นต้น ตัวอย่างการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด เช่น เลคติน (lectin) เป็นไกลโคโปรตีน ที่สามารถจดจำและจับกับคาร์โบไฮเดรตได้อย่างจำเพาะและป้องกันการติดเชื้อต่างๆ เนื่องจากเลคตินสามารถจับกับคาร์โบไฮเดรตและโครงสร้างที่ซับซ้อนของผนังเซลล์แบคทีเรียได้ จึงเป็นตัวการสำคัญในระบบการรับรู้ถึงการบุกรุกของสิ่งแปลกปลอมในกิ้ง (Ratcliffe; et al. 1985: 183-350) Vazquez และคนอื่นๆ (1993) พบว่า เลคตินของกิ้งก้ามกราม สามารถทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวกได้ เนื่องจากเลคตินสามารถจับ O-keto และ O-methyl ของน้ำตาลและอนุพันธ์ของน้ำตาลที่มีหมู่อะซิติก (acetyl group) จากโพลีแซคคาไรด์บนผนังเซลล์แบคทีเรียเหล่านี้ได้ ส่วนไลโซไซม์เป็นเอนไซม์ที่ทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกแตกออกแต่ไม่สามารถทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบได้

ระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดมีบทบาทที่สำคัญอีกกระบวนการหนึ่ง คือ proPO เป็นกระบวนการสร้างเม็ดสีดำที่เรียกว่า เมลานิน (melanin pigment) โดย melanin จะเป็นตัวทำลายสิ่งแปลกปลอมที่อยู่ใน hemocyte ระบบ proPO จะทำงานโดยอาศัยองค์ประกอบของเอนไซม์ prophenol oxidase ซึ่งจะพบได้ใน ชนิด semigranular และ granuocyte โดยจะมีการเก็บเอนไซม์ไว้ในเม็ดกรานูลที่อยู่ใน cytoplasm การทำงานของระบบจะเริ่มต้นเมื่อ hemocyte ที่มีกรานูลถูกกระตุ้นด้วยผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ที่มีองค์ประกอบจำพวกไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide, LPS), เปปทิโดไกลแคน (peptidoglycan, PG) และ เบต้า -1,3 กลูแคน (β -1-3-glucan, BG) จับกับตัวรับบนผิวเซลล์ของ hemocyte โดยอาศัยโมเลกุลจดจำที่จำเพาะ ได้แก่ โปรตีนที่จับจำเพาะกับเบต้า -1,3 กลูแคน (BGBP; β -1-3-glucan binding protein) และโปรตีนที่จำเพาะกับไลโปโพลีแซคคาไรด์และเบต้า -1,3 กลูแคน (LGBP; LPS- และ β -1-3-glucan binding protein) (Duvic; & Söderhäll. 1990: 27-32, Lee; Wang; & Söderhäll. 2000: 1337-1343) จากนั้นจะชักนำให้เกิดปฏิกิริยาต่างๆ ตามมา เช่น การแผ่ขยายและการสลายกรานูลของเซลล์ hemocyte (Barracco; Duvic; & Söderhäll. 1991: 491-497) สนับสนุนให้ agranulocyte มีอัตราการกลืนกินเร็วขึ้น (Thornqvist; Johansson; & Söderhäll. 1994: 3-12) การสลายของเซลล์ hemocyte ชนิด granular ทำให้เกิดการหลั่งสารที่เป็นองค์ประกอบของระบบ proPO และสารอื่นๆ ที่สำคัญในการป้องกันตัวออกมาจากกรานูล การกระตุ้นระบบ proPO ถูกควบคุมด้วยเอนไซม์ serine proteinase (Söderhäll. 1982: 601-611, Söderhäll; & Cerenius. 1998: 23-28) และเรียกเอนไซม์นี้ว่า ppA (prophenoloxidase activating enzyme) โดยเอนไซม์ ppA เป็น trypsin-like proteinase ซึ่งถูกเก็บไว้ในรูป inactive ภายในกรานูล เอนไซม์นี้จะหลั่งออกมาพร้อมกับ prophenol oxidase และเปลี่ยนเป็นรูป active ที่สามารถเปลี่ยนโปรตีน prophenol oxidase ไปเป็น phenoloxidase; PO (Aspan; & Söderhäll. 1991: 363-373, Aspan; et al. 1995: 932-943) เอนไซม์ PO เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ melanin ซึ่งเป็นพิษต่อจุลชีพสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ (Söderhäll; & Cerenius. 1998: 23-28, Knaap. 1993)

การศึกษาเกี่ยวกับภูมิคุ้มกันและการกำจัดไวรัสในกุ้งก้ามกราม

การศึกษาเกี่ยวกับการกำจัดไวรัสออกจากกุ้งก้ามกรามและการเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ต่างๆ ในระบบภูมิคุ้มกัน โดยในปี 2008 Sarathi และคนอื่นๆ ทดลองนำกุ้งก้ามกรามโตเต็มวัยมาทำให้ติดเชื้อไวรัส WSSV จากนั้นเก็บตัวอย่าง gill, pleopods, head soft tissue และ hemolymph โดยเก็บที่เวลาต่างๆ หลังจากฉีดเชื้อถึงวันที่ 1, 3, 5, 10, 25, 50, 75 และ 100 จากนั้นนำไปตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยวิธี PCR และ nested-PCR พบว่าในวันที่ 3 หลังจากฉีดเชื้อ กุ้งก้ามกรามมีลักษณะเชื่องซึมและไม่กินอาหารซึ่งต่างจากกลุ่มควบคุมที่กินอาหารเป็นปกติ และในระหว่างการทดลอง (ระยะเวลา 100 วัน) กุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ WSSV ไม่มีการตาย จากผลการทำ PCR เพื่อตรวจหาเชื้อ WSSV แสดงให้เห็นว่า อวัยวะกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อทุกอวัยวะ จะให้ผลบวกในวันที่ 1, 3 และ 5 แต่ให้ผลลบตั้งแต่วันที่ 10 เป็นต้นไป ส่วนผลการทำ nested PCR แสดงให้เห็นว่า ทุกอวัยวะของกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อจะให้ผลบวกในวันที่ 3 ถึง 25 ส่วนในวันที่ 50 เฉพาะเนื้อเยื่อส่วนหัวเท่านั้นที่ให้ผลบวก และตั้งแต่วันที่ 75 จนถึงวันที่ 100 พบว่ากุ้งก้ามกรามสามารถกำจัดไวรัสออกจากร่างกายได้ เมื่อศึกษาพารามิเตอร์ของระบบภูมิคุ้มกันต่างๆ ในกุ้งที่ติดเชื้อ เช่น proPO, superoxide anion และ clotting time พบว่ากุ้งที่ติดเชื้อมีการแสดงออกสูงกว่ากลุ่มควบคุม ขณะที่ THC และ SOD มีการแสดงออกลดลง (Sarathi; et al. 2008: 222-230) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Ravi และคนอื่นๆ ที่ทดลองนำกุ้งก้ามกรามโตเต็มวัยมาทำให้ติดเชื้อไวรัส MnNV และ XSV จากนั้นสุ่มเก็บตัวอย่างอวัยวะต่างๆ คือ gill, head soft tissue, pleopods และ gut โดยเก็บที่เวลาต่างๆ หลังจากฉีดเชื้อถึงวันที่ 3, 5, 10, 25, 50, 75 และ 100 จากนั้นนำไปตรวจหาเชื้อไวรัสทั้งสองด้วยวิธี RT-PCR และ nested RT-PCR พบว่าช่วงระยะเวลา 100 วัน ของการทดลองไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้ ไม่สามารถทำให้เกิดอาการทางคลินิกหรือการตายในกุ้งโตเต็มวัย นอกจากนี้ผลของ RT-PCR แสดงให้เห็นว่าทุกอวัยวะของกุ้งให้ผลบวกกับเชื้อไวรัสทั้งสองในวันที่ 3, 5 และ 10 และให้ผลบวกด้วยวิธี nested RT-PCR ในวันที่ 15 และ 20 แต่ทุกอวัยวะจะให้ผลลบในวันที่ 25 เป็นต้นไป เมื่อศึกษาพารามิเตอร์ของระบบภูมิคุ้มกันต่างๆ ในกุ้งที่ติดเชื้อ เช่น proPO, superoxide anion, SOD, THC, clotting time และ oxyhemocyanin พบว่า มีการแสดงออกที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในบางพารามิเตอร์ในช่วงวันแรกๆ ของการติดเชื้อและกลับมาแสดงออกปกติในช่วงต่อมา (Ravi; et al. 2010: 428-433)

แต่อย่างไรก็ตามในงานวิจัยทั้ง 2 นี้ไม่ได้มีการศึกษาโมเลกุลอื่นที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน เช่น Toll receptor ซึ่งอาจเป็นพารามิเตอร์หนึ่งที่น่าสนใจและมีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งด้วย

Toll-like receptor; TLR และ Toll receptor; Toll

โมเลกุลของ Toll พบครั้งแรกในแมลงหวี่ *Drosophila melanogaster* (dToll) ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ embryonic patterning และการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (Belvin; & Anderson. 1996: 393–416) โดยมีคุณสมบัติเป็น antifungal และ anti Gram-positive bacterial activity (Lemaitre; et al. 1996: 973-983, Lemaitre; et al. 1997: 14614-14619) ส่วนในยุง *Aedes aegypti* พบว่า มีคุณสมบัติ antiviral activity (Xi; et al. 2008) หลังจากค้นพบ Toll receptors ได้ไม่นาน Akira และคนอื่นๆ สามารถแยกยีนที่จัดอยู่ในตระกูลเดียวกับ Toll และให้ชื่อว่า Toll-like receptors (TLRs) โดยแยกได้จากจีโนมของสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Akira; Uematsu; & Takeuchi. 2006: 783–801) และพบว่า TLRs มีโครงสร้างและการทำงานคล้ายกับ Toll receptor จาก *Drosophila species*

TLRs เป็นหนึ่งในสมาชิกของกลุ่มตัวรับ pattern recognition receptors (PRR) จัดเป็นศูนย์กลางของระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด นอกจากนี้ยังเป็นตัวกลางเชื่อมระหว่างระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดกับระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจง (Akira; & Takeda. 2004: 499–511) โดย TLRs สามารถตอบสนองต่อแบคทีเรียผ่านการผลิต proinflammatory cytokines และ chemokines จากนั้นจะส่งสัญญาณเป็นลำดับขั้นไปกระตุ้นการทำงานของระบบ antigen presentation (Akira; & Takeda. 2004: 499–511, Akira; Uematsu; & Takeuchi. 2006: 783–801) TLRs จัดอยู่ใน class I receptors ซึ่งประกอบด้วยสายของ α -helix 1 สาย (ภาพประกอบ 2) TLRs จะจดจำและตอบสนองต่อองค์ประกอบต่างๆ ของแบคทีเรีย ไวรัส และ เชื้อรา เช่น lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ outer membrane ในแบคทีเรียแกรมลบ peptidoglycan เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ในแบคทีเรียแกรมบวก single-stranded (ss) RNA และ double-stranded (ds) RNA จากเชื้อไวรัส สมาชิกในตระกูล TLRs มักพบอยู่บนผิวเซลล์ที่เป็นกลุ่มเซลล์ที่มาจากระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดและเซลล์ที่ไม่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน เช่น neutrophils, monocytes, macrophages, dendritic cells, B-cells, NK (natural killer) cells, fibroblast cells, epithelial cells และ endothelial cells. (Iwasaki; & Medzhitov. 2004: 987-995) โดย TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 และ TLR6 จะแสดงออกบนผิวเซลล์ ขณะที่ TLR3, TLR7, TLR8 และ TLR9 จะแสดงออกภายใน endosomes (Himansh; Taro; & Shizuo. 2009: 1–16)

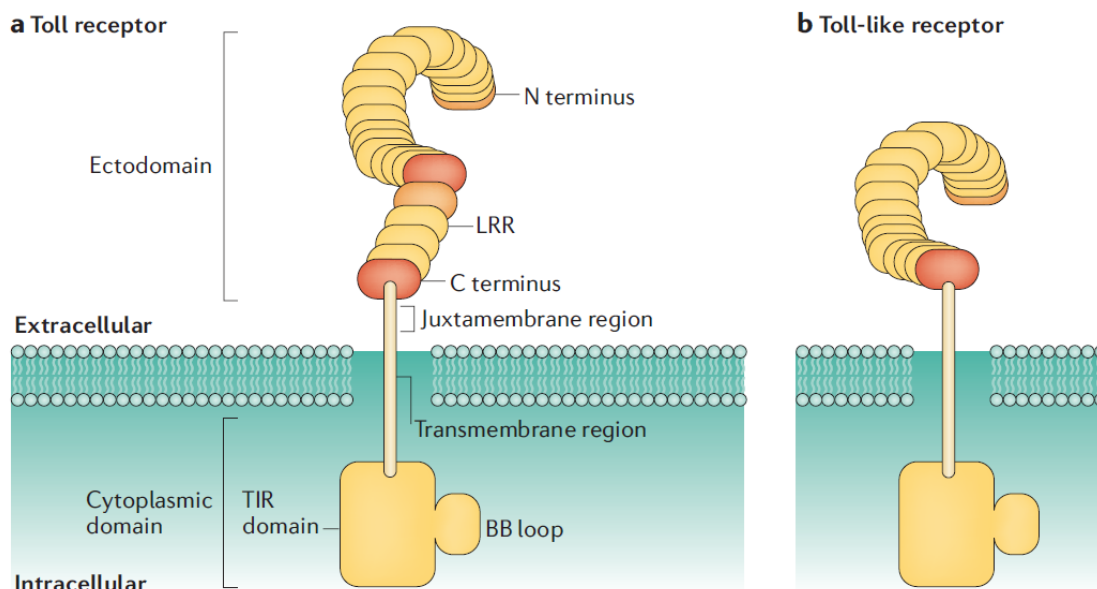
โครงสร้างของ Toll family receptors

สมาชิกของตระกูล Toll และ TLR จะมีโครงสร้างที่มีการอนุรักษ์ร่วมกัน 3 บริเวณ คือ transmembrane glycoproteins ซึ่งจะอยู่ระหว่าง membrane ของเซลล์ บริเวณ extracellular domain และ cytoplasmic signaling domain ซึ่งจะอยู่ภายในเซลล์ (Rock; et al..1998: 588–593) บริเวณ extracellular domain ซึ่งจะอยู่ภายนอกเซลล์ (ectodomains) พบองค์ประกอบของกลุ่มกรดอะมิโน 24 หน่วยเรียงตัวซ้ำๆ กัน ที่เรียกว่า leucine-rich repeat (LRR) (ภาพประกอบ 3) และส่วนใหญ่จะพบโครงสร้างของ cysteine-rich capping ที่ปลาย amino (N) และปลาย carboxyl (C) TLRs จะพบกลุ่มของ LRRs เพียงกลุ่มเดียว แตกต่างจาก dToll เพียงเล็กน้อยคือ dToll จะพบกลุ่มของ LRRs 2 กลุ่มต่อเนื่องกัน ลำดับกรดอะมิโนบริเวณ LRR ของ TLRs จะเป็นบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic ที่มีการเรียงตัวซ้ำๆ ร่วมกันและมีการจัดเรียงกันเป็นกลุ่มโดยมีจำนวนกรดอะมิโน 24 หน่วย เรียงเป็นลำดับดังนี้

x-L-x-x-L-x-L-x-x-N-x-φ-x-x-φ-x-x-x-F-x-x-L-x

โดย x แทนกรดอะมิโนใดๆ , φ แทนกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic, L แทนกรดอะมิโนลิซีน (leucine) และ F แทนกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) แต่บางครั้ง F และ L จะถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic residues อื่นๆ (Bell; et al. 2003: 528-533) ซึ่งกรดอะมิโน 24 หน่วยนี้จะเรียงตัวซ้ำกัน 19-25 ซ้ำ (Jessica ; et al. 2003: 528-533)

กลุ่มของกรดอะมิโนซ้ำๆ เหล่านี้ มักจะพบในโปรตีนที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ของเซลล์ ตั้งแต่ RNA processing, transcriptional regulation จนถึง cell adhesion, bacterial pathogenesis และ signal transduction (Buchanan; & Gay. 1996: 1–44) โครงสร้างของแต่ละ LRR จะพับจนมีลักษณะโค้งเกลียวคล้ายเกือกม้า (horseshoe-shaped solenoid) ประกอบด้วยแผ่น β-sheet อยู่ภายในผิวหน้าของส่วนเว้าและ ligand-binding insertions ซึ่งเป็นบริเวณที่จับกับ pathogen-associated molecular patterns (PAMP) แทรกอยู่ภายในส่วนเว้านี้ ดังนั้นลำดับกรดอะมิโนที่อนุรักษ์ของ LRR จึงเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการคงรูปของโครงสร้างนี้ เนื่องจากบริเวณอนุรักษ์จะเป็นแกน (hydrophobic core) ของแต่ละ LRR (ภาพประกอบ 3)



ภาพประกอบ 2 แสดงโครงสร้างและความแตกต่างของ Toll และ TLR

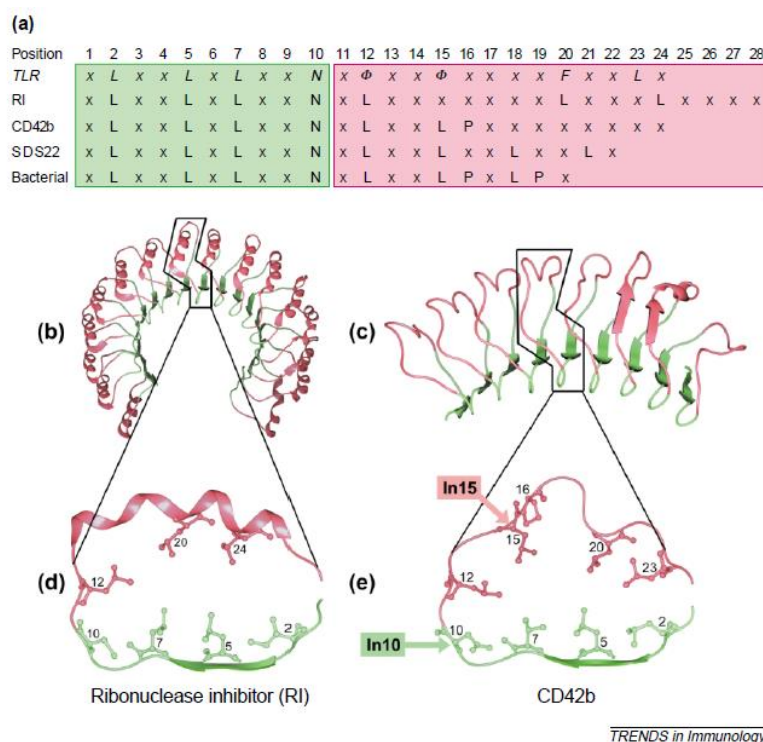
โดยแสดงบริเวณ extracellular, transmembrane และ cytoplasmic domains ของ (a) Toll receptors (*dToll*) (b) TLR ซึ่งจะเห็นว่า *dToll* ประกอบด้วยกลุ่มของ LRRs 2 กลุ่มที่บริเวณ ectodomain ขณะที่ TLR มี LRRs เพียงกลุ่มเดียว

C terminus หมายถึง carboxyl terminus;

N terminus หมายถึง amino terminus;

TIR domain หมายถึง Toll/interleukin-1-receptor-containing domain

ที่มา: Nicholas J. Gay; Monique Gangloff ; & Alexander N. R. Weber. (2006) *Toll-like receptors as molecular switches*. p. 694.



ภาพประกอบ 3 โครงสร้างปฐมภูมิ ทติยภูมิ และ ตติยภูมิ ของ leucine-rich repeat (LRR)

- (a) บริเวณอนุรักษ์ของ LRR (กรดอะมิโน 10 ตำแหน่งแรกในกรอบสีเขียว ซึ่งอยู่ในส่วนหัวของโครงสร้างทุติยภูมิ) ซึ่งเป็นโครงสร้างของ LRR ทุกชนิด (ในกรอบสีชมพูคือตำแหน่งของกรดอะมิโน ที่อยู่ภายนอกหรือส่วนหาง ซึ่งโครงสร้างนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของรีเซปเตอร์ต่างๆ) โดยแสดงบริเวณอนุรักษ์ของ LRR ของ TLRs, ribonuclease inhibitor (RI), CD42b เมื่อ x แทนกรดอะมิโนใดๆ, L แทนกรดอะมิโนลิซีน (leucine) และ F แทนกรดอะมิโนฟีนิลอลานีน (phenylalanine) แต่บางครั้ง F และ L จะถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic residues อื่นๆ กรดอะมิโน N ที่ตำแหน่ง 10 บางครั้งอาจถูกแทนที่ด้วย C, S หรือ T
- (b,c) โครงสร้างตติยภูมิของ RI (b) และ CD42b (c) โครงสร้างโซลินอยด์ (solenoid structures) ของรีเซปเตอร์ทั้ง 2 ชนิด เกิดจากการขดเข้าไปมาของแต่ละ LRRs
- (d,e) โครงสร้างทุติยภูมิแสดงไดอะแกรมของแต่ละซ้ำของ LRRs RI (d) และ CD42b (e) โครงสร้างส่วนที่เป็นลูปของทั้งสองยีนเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ โดยส่วนสีเขียวแทน β -strand และบริเวณ variable แสดงในส่วนสีชมพู [สอดคล้องกับ (a)]

ที่มา: Jessica, K. Bell.; et al. (2003). *Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors*. p. 530.

LRR สามารถจับกับโครงสร้างโมเลกุลที่จำเพาะหลายๆ ชนิดของเชื้อโรคที่เรียกว่า PAMP ได้ โดย PAMP คือกลุ่มองค์ประกอบที่มีลักษณะคงที่ ไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลงและมีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิด PAMP มี ลักษณะหลัก 3 ประการคือ 1) PAMP จะพบเฉพาะในเชื้อโรคเท่านั้น ไม่พบในคนหรือสัตว์ และยอมให้ระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดตรวจจับว่าเป็นเชื้อโรคหรือไม่เป็นเชื้อโรคได้ 2) PAMP จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเชื้อโรคหากหายไปหรือมีการกลายพันธุ์ไปจะทำให้เชื้อโรคตายได้ ดังนั้นจึงมีความคงตัวสูง และ 3) PAMP ของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ในกลุ่มเดียวกันจะมีลักษณะที่เหมือนกัน จึงทำให้เซลล์สามารถใช้ TLRs เพียงไม่กี่ชนิดในการตรวจจับ PAMP ตัวอย่างของ PAMP เช่น peptidoglycan เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ในแบคทีเรียแกรมบวกทุกชนิดจะจับกับ TLR2 LPS เป็นองค์ประกอบของ outer membrane พบในแบคทีเรียชนิดแกรมลบเกือบทุกชนิดจะจับกับ TLR2 และ TLR4 อาร์เอ็นเอสายคู่ ซึ่งไม่พบในคนและสัตว์แต่มักพบในเชื้อไวรัสหลายๆ ชนิดจะจับกับ TLR3 และ flagellin ซึ่งเป็นโปรตีนองค์ประกอบของ flagella ในแบคทีเรียหลายชนิดจะจับกับ TLR5 เป็นต้น (Nicholas; Monique; & Alexander. 2006: 693-698)

ใน LRR มีการศึกษาที่คาดว่าส่วน side chains บริเวณ variable residues ที่ยื่นออกมาจาก β -strand ของแต่ละ LRR ซึ่งโครงสร้างนี้จะอยู่ที่ผิวหน้าของส่วนเว้า (concave) ของ solenoid จะเป็นส่วนที่จับกับ PAMP การจัดเรียง side chains ของ LRR จะเป็นรหัสที่ทำให้ Toll หรือ TLR มีตัวจับหรือ ligands ที่จำเพาะต่อ PAMP แตกต่างกันไป LRRs สามารถจับกับโปรตีนที่จำเพาะต่างๆ และชีวโมเลกุลอื่นๆ คุณสมบัติที่กล่าวมาของ LRRs เป็นตัวบ่งชี้ความสามารถในการจับกับเชื้อโรคต่างๆ ที่แตกต่างกันของสมาชิกในตระกูล Toll ในการส่งสัญญาณเพื่อตอบสนองต่อสิ่งเร้า (Nicholas; Monique; & Alexander. 2006: 693-698)

โครงสร้างทางปลาย C (C-terminal capping) ของ Toll และ TLRs จะเชื่อมต่อกับ single transmembrane α -helix และจะอยู่ภายใน cytoplasmic domain มีลักษณะคล้ายคลึงกับ interleukin 1 receptor (IL-1R) จึงเรียกโครงสร้างนี้ว่า Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain หรือ TIR identity region ซึ่งโครงสร้างนี้จะทำหน้าที่ส่งสัญญาณต่างๆ (downstream signal transduction) เข้าสู่ภายในเซลล์ หลังจากที่ LRR จับกับ PAMP โดยจะส่งสัญญาณเป็นลำดับขั้นไปกระตุ้นการทำงานของ proinflammatory cytokines และ chemokines เป็นต้น (Bowie. & O'Neill. 2000: 508-514)

ดังนั้นจะเห็นว่าเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดจะถูกกระตุ้นและมีการตอบสนองได้เฉพาะสิ่งที่เป็เชื้อจุลินทรีย์เท่านั้น ซึ่งเป็นการตรวจว่าสิ่งที่พบเป็นเชื้อโรคหรือไม่ และหากพบว่าเป็นเชื้อโรค เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดจะถูกกระตุ้นก่อนเพื่อทำลายเชื้อโรคนั้นและเซลล์ดังกล่าวจะไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจงต่อไปเพื่อช่วยในการกำจัดเชื้อโรคดังกล่าวอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป (Akira; & Takeda. 2004: 499-511)

การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับ Toll receptors ในกุ้ง

เมื่อไม่นานมานี้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งชนิดต่างๆ เช่น anti-LPS factor lysozyme (Somboonwivat; et al. 2005: 841–851) และ antibacterial peptides (Destoumieux; et al. 2000: 461-469) และได้มีการโคลนยีน ที่เกี่ยวกับ pattern-recognition ในกุ้งตระกูล Penaeid เช่น ยีน β -1,3-Glucan binding protein จาก *P. monodon* (Sritunyalucksana; Lee; & Söderhäll. 2002: 237-245) และ *L. vannamei* (Romo-Figueroa; et al. 2004: 713-726) ยีน LPS และ ยีน β -1,3-Glucan binding protein จาก *L. vannamei* (Cheng; et al. 2005: 297–310) และ *L. stylirostris* (Roux; et al. 2002: 7140–7149) ยีน Lectin จาก *P. monodon* (Luo; et al. 2006: 607–617) และ *L. schmitti* (Cominetti; et al. 2002: 715–721) ซึ่งยีนเหล่านี้จัดเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันการบุกรุกของแบคทีเรีย อย่างก็ตามกลไกการทำงานยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

ถึงแม้ว่ากลไกการป้องกันโดยอาศัยการส่งสัญญาณของ Toll ในกุ้งยังไม่มีผู้ทราบแน่ชัดแต่ก็มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับ ยีน Toll เพิ่มมากขึ้นโดยเริ่มตั้งแต่ปี 2007 มีการโคลนยีนบางส่วนของ Toll จากกุ้งกุลาดำ *P. monodon* Toll (*PmToll*) โดยใช้ primers ที่ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ของ TIR domain โดยกรดอะมิโนที่แยกได้ มีความเหมือน (identity) ร้อยละ 59 กับ *Apis mellifer* Toll ผลการวิเคราะห์บริเวณ LRRs ของ *PmToll* ไม่พบบริเวณ PAMP-binding insertions การวิเคราะห์ phylogenetics เทียบกับ Toll ในกลุ่มของแมลงพบว่า *PmToll* จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ Toll1 และ Toll5 ของ *dToll* และการศึกษาโดย RT-qPCR แสดงให้เห็นว่า *PmToll* แสดงออกใน intestine, gill และ hepatopancreas และเมื่อทำให้กุ้งติดเชื้อ WSSV จะพบว่ากลุ่มที่ติดเชื้อ WSSV และกลุ่มควบคุมมีการแสดงออกของยีน Toll ในแต่ละอวัยวะใกล้เคียงกัน (Joop; et al. 2007: 504-513)

ในเวลาใกล้เคียงกันได้มีการค้นพบยีนที่มีความเหมือนกับยีนสำหรับ Toll receptor ในกุ้งขาว *L. vannamei* เป็นครั้งแรกโดยมีการโคลน cDNA จาก Toll receptor พบว่า *L. vannamei* Toll (*LvToll*) แปลรหัสให้กรดอะมิโน 926 หน่วย และมี signal peptide ความยาว 19 หน่วย โดยโปรตีน Toll จากกุ้งจะมีความแตกต่างจาก TLRs family ทั้งด้านโครงสร้างและการทำงาน โดยมีส่วนของ extracellular domain ที่ประกอบด้วย LRRs 16 บริเวณ ขนาบด้วย cysteine-rich motifs และส่วนของ cytoplasmic TIR domain ส่วน TIR domain ของ *LvToll* มีความเหมือนร้อยละ 59.9 และร้อยละ 54.3 กับ *A. mellifer* Toll และ *D. melanogaster* Toll ตามลำดับ การวิเคราะห์โดยวิธี RT-PCR แสดงให้เห็นว่า *LvToll* มีการแสดงออกใน hemocyte gill heart brain stomach intestine pyloric

caecum muscle nerve และ spermary และมีการแสดงออกต่ำใน eyestalk และ hepatopancreas (Yang; et al. 2007: 1999–2008)

จากการค้นพบยีน *Toll* จากกุ้งตระกูล Penaeid ในกุ้งขาว (*LvToll*) และกุ้งกุลาดำ (*PmToll*) ต่อมาในปี 2008 มีรายงานการค้นพบยีน *Toll* ชนิดใหม่ในกุ้งลายเสือ *Marsupenaeus japonicus Toll (MjToll)* โดย cDNA ที่แยกได้มีความยาว 3,095 นิวคลีโอไทด์ และแปลรหัสให้กรดอะมิโน 1,009 หน่วย การศึกษาการแสดงออกของยีน *MjToll* โดยวิธี immunostimulation พบว่ามีการแสดงออกในเนื้อเยื่อต่างๆ หลายชนิดได้แก่ gill, intestine, lymphoid organ, heart, hematopoietic organ, hemocyte, ventral abdominal nerve cord, eyestalk neural ganglia และ brain tissues โดยเมื่อกระตุ้นด้วย peptidoglycan พบว่าที่ 12 ชั่วโมง ยีน *MjToll* ใน lymphoid organ จะแสดงออกมากถึง 76 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนพบว่า *MjToll* มีความเหมือนกับโปรตีน *Toll* ของกุ้งตระกูล Penaeid ร้อยละ 59 (Mekata; et al. 2008: 122–133)

ในปีเดียวกันมีการแยกยีนที่มีความเหมือนกับยีน *Toll* จากกุ้ง *Fenneropenaeus chinensis* และให้ชื่อว่า *FcToll* โดย cDNA ที่แยกได้มีความยาว 4,115 นิวคลีโอไทด์ และแปลรหัสให้กรดอะมิโน 931 หน่วย โปรตีน *FcToll* ประกอบด้วยส่วนของ extracellular domain ที่มี signal peptide, LRRs 16 บริเวณ, LRR-C-terminal (LRR-CT) motifs 2 บริเวณ และ LRR-N-terminal (LRR-NT) motifs 2 บริเวณ นอกจากนี้ยังมีส่วนของกรดอะมิโนที่เป็น transmembrane segment 23 หน่วย และส่วนของ cytoplasmic TIR domain ความยาว 139 หน่วย ยีน *FcToll* ประกอบด้วย 5 exons และ 4 introns การวิเคราะห์ phylogenetics พบว่า *FcToll* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับโปรตีน *Toll* ในกลุ่มของแมลง (insect-type invertebrate *Toll* family) การศึกษาการแสดงออกของ *FcToll* พบว่า *FcToll* แสดงออกในเนื้อเยื่อต่างๆ หลายชนิด เช่น hepatopancreas, stomach, epidermis, ovary, ganglion, intestine, hemocytes, heart, muscle, gill และ lymphoid organ โดยจะแสดงออกมากใน lymphoid organ การศึกษาโดยวิธี real-time PCR แสดงให้เห็นว่ามีการแสดงออกของยีน *FcToll* ในระดับที่แตกต่างกันหลังจากถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรีย หรือ ไวรัส โดยระดับการแสดงออกของ *FcToll* เพิ่มขึ้นหลังจากกักตุนเชื้อ *V. anguillarum* นาน 5 ชั่วโมง แต่ในกรณีของการติดเชื้อไวรัสระดับการแสดงออกจะลดลงทันทีหลังการติดเชื้อ WSSV จากผลงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า *FcToll* มีความเกี่ยวข้องกับการป้องกันเชื้อโรคในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อเชื้อ *V. anguillarum*. (Yang; et al. 2008: 564–574)

ในปี 2010 ได้มีการศึกษาการตอบสนองของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ innate immune response ในกุ้ง *L. vannamei* โดยใช้เทคนิค real-time PCR หลังจากที่ถูกฉีดด้วยเชื้อ *V. harveyi* ซึ่งพบว่า 36 ชั่วโมงหลังจากฉีดแบคทีเรีย ระบบ proPO activating system มีการแสดงออกของยีน *proPO* เพิ่มขึ้น 3.3 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม transglutaminase (TGase) และ clotting protein ซึ่งเกี่ยวข้องกับ hemolymph clotting มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับยีนในระบบ

antimicrobial peptide system ทั้ง 5 ยีน ประกอบด้วยยีนสำหรับ anti-lipopolysaccharide factor (ALF), crustin, lysozyme (Lyz), penaeidin2 (PEN2) และ penaeidin4 (PEN4) พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นด้วย ยกเว้นยีนสำหรับ penaeidin3 (PEN3) ส่วนยีนสำหรับ SOD ซึ่งเป็นยีนในระบบ antioxidant defense system พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ขณะที่ยีนสำหรับ glutathione peroxidase (GPx) มีการแสดงออกลดลง สำหรับระบบ pattern recognition receptor system พบว่าที่ 24 ชั่วโมงหลังจากฉีดแบคทีเรีย ยีน *LvToll* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นมากกว่ายีนชนิดอื่นที่ศึกษา และแสดงออกสูงกว่ากลุ่มควบคุมถึง 15 เท่า และเมื่อใช้วิธี RNA silencing ยับยั้งการแสดงออกของยีน *LvToll* จากนั้นฉีดกุ้งด้วย WSSV ไม่พบความแตกต่างของอัตราการตายระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ฉีด RNAi อย่างไรก็ตามเมื่อฉีดกุ้งด้วย *V. harveyi* พบว่าอัตราการตายของกุ้งและจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นในกลุ่มกุ้งที่ฉีดด้วย dsRNA ต่อ *LvToll* จึงสรุปว่า *LvToll* มีความสำคัญในระบบ immune response ต่อการติดเชื้อ *V. harveyi* แต่ไม่มีผลต่อการติดเชื้อ WSSV (Han-Ching Wang; et al. 2010: 49–58)

ในปีเดียวกันมีงานวิจัยที่ใช้เทคนิค two dimensional electrophoresis (2-DE) เพื่อศึกษาเกี่ยวกับกลไกทางโมเลกุลที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาว *F. chinensis* ผลการศึกษาพบว่ากุ้งขาวในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ติดเชื้อ WSSV ที่ชั่วโมงที่ 6 12 และ 24 หลังการติดเชื้อจะมีการแสดงออกของโปรตีนที่พบในดับเบิลในระดัที่แตกต่างกัน ผลการศึกษา quantitative intensity analysis และ mass spectrometry พบว่าโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งจะมีการแสดงออกสูงขึ้น เช่น Toll receptor, Leucine-rich repeat protein, peroxinectin และ serine proteinase-like protein ส่วนโปรตีนที่มีการแสดงออกลดลง เช่น heat shock protein, ATP synthase sub-unit beta และ thrombospondin พบว่ามีการแสดงออกลดลงในกลุ่มกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV ผลการศึกษาที่ได้นี้ช่วยให้ทราบข้อมูลเกี่ยวกับโปรตีนของกุ้งที่เกี่ยวข้องในกระบวนการติดเชื้อเชื้อไวรัส (Ying; et al. 2010: 480-486)

แม้ว่าจะมีการโคลนยีน *LvToll1* และศึกษาหน้าที่ของ Toll receptor จาก *L. vannamei* ในปี 2007 แต่ก็ยังไม่ทราบกลไกการทำงานที่แน่ชัด ต่อมาในปี 2011 มีการรายงานยีนสำหรับ Toll receptor จาก *L. vannamei* เพิ่มเติมอีก 2 ยีนคือ *LvToll2* และ *LvToll3* โดยพบว่าโปรตีน *LvToll2* มีกรดอะมิโน 1,009 หน่วย ประกอบด้วยส่วนของ extracellular domain ที่มี LRRs 18 บริเวณ และส่วนของ cytoplasmic TIR domain ความยาว 139 หน่วย สำหรับโปรตีน *LvToll3* มีกรดอะมิโน 1,224 หน่วย ประกอบด้วยส่วนของ extracellular domain ที่มี LRRs 23 บริเวณ และส่วนของ cytoplasmic TIR domain ความยาว 138 หน่วย การศึกษาโปรตีน *LvToll1*, *LvToll2* และ *LvToll3* ในเซลล์เพาะเลี้ยง *Drosophila Schneider* 2 (S2) พบว่าโปรตีน *LvToll1* และ *LvToll3* พบได้ทั้งบริเวณ membrane และ cytoplasm ส่วน *LvToll2* จะพบภายใน cytoplasm และ *LvToll2* สามารถส่งสัญญาณไปกระตุ้น nuclear factor kappa B (NF- κ B) ซึ่งเป็น transcription factor ทำให้มีการสร้าง antimicrobial peptide นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของยีน *LvToll1*, *LvToll2* และ *LvToll3*

ในหลายๆ อวัยวะ โดยหลังจากทำให้กุ้งติดเชื้อ *V. alginolyticus* พบว่าใน gill กุ้ง *LvToll1* จะมีการแสดงออกสูงขึ้น แต่ *LvToll2* และ *LvToll3* มีการแสดงออกยังไม่ชัดเจนมากนัก และเมื่อทำให้กุ้งติดเชื้อ WSSV พบว่า ใน gill กุ้ง *LvToll1*, *LvToll2*, *LvToll3* มีการแสดงออกสูงขึ้นยกเว้นชั่วโมงที่ 12 จะมีการแสดงออกลดลง (Wang; et al. 2012: 359-371)

โดยทั่วไปหากมีการฉีด dsRNA ที่ไม่จำเพาะเข้าไปในกุ้ง dsRNA จะไปกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อไวรัสในกุ้งขาว *L. vannamei* อย่างไรก็ดีตามรีเซปเตอร์ที่เกี่ยวข้องในการจับกับผลผลิตที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ในกรณีสัตว์มีกระดูกสันหลังเมื่อพบ dsRNA ภายในเซลล์ dsRNA จะถูกจับโดย TLR3 จากนั้นจึงส่งสัญญาณไปกระตุ้นระบบ interferon ต่างๆ เมื่อมีการค้นพบยีน *LvToll* จากกุ้งขาว *L. vannamei* นักวิทยาศาสตร์จึงสนใจศึกษาความสามารถของ *LvToll* receptor ในการจับกับ dsRNA ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า การฉีด dsRNA ที่ไม่จำเพาะไม่ได้ไปกระตุ้นการแสดงออกของยีน *LvToll* ให้เพิ่มขึ้นแต่อย่างใด และการยับยั้งการแสดงออกของ *LvToll* ก็ไม่ได้ทำให้ความสามารถของรีเซปเตอร์ที่เกี่ยวข้องในการจับกับ dsRNA ที่ไม่จำเพาะสูญเสียไป (dsRNA เป็นผลผลิตที่เกิดจากเชื้อ WSSV) จากข้อมูลนี้จึงเสนอว่าการทำงานของ *LvToll* ไม่มีบทบาทที่เกี่ยวข้องกับ dsRNA ที่เหนี่ยวนำให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อไวรัส (Yannick; et al. 2009: 806–810)

ฮีโมไซยานิน (hemocyanin)

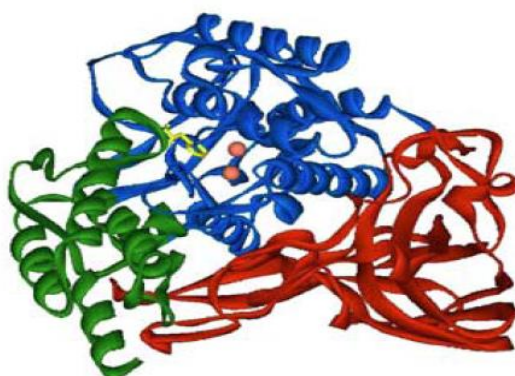
นอกเหนือจาก Toll receptor ที่ทำหน้าที่เป็น PRR ในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดของกิ้งแล้ว ยังมีโปรตีนในระบบสารน้ำที่มีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น hemocyanin เป็นต้น (Flegel; & Sritunyalucksana. 2011: 587–607) hemocyanin มีความสัมพันธ์กับเอนไซม์ phenol oxidase ในด้านความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนและมีหน้าที่คล้ายกัน เอนไซม์ phenol oxidase มีบทบาททางชีวภาพโดยเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองของครัสเตเชียนบ่งชี้ว่า hemocyanin น่าจะเป็นโปรตีนหนึ่งที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกลไกป้องกันตนเองเช่นกัน (Lee; Lee; & Söderhäll. 2004: 490-496)

hemocyanin เป็นโปรตีนเชิงซ้อนที่ประกอบด้วยหลายหน่วยย่อย มี Cu^{2+} จับกับโมเลกุลของโปรตีน พบเป็นส่วนประกอบหลักประมาณร้อยละ 90-95 ใน hemolymph (Adachi; et al. 2005: 136-143, Van Holde; & Miller. 1995: 1-81, Sellos; Lemoine; & Wormhoudt. 1997: 153-158, Markl; & Decker. 1992: 325-376) ในสัตว์กลุ่มมอลลัสต์ (mollusk) เช่น ปลาหมึก *Octopus vulgaris* (Salvato; et al. 1998: 14065-14077) และ *O. bimaculatus* (Herskovits; & Villanueva. 1986: 931-939) ในหอยทะเล เช่น *Cryptochiton stelleri* (Herskovits; & Hamilton. 1987a: 641-649), *Stenoplax conspicua* (Herskovits; & Hamilton. 1987b: 127-132), และ *Acanthopleura granulate* (Herskovits; Hamilton; & Mazzella. 1986: 3612-3619) สัตว์กลุ่มอาร์โทรพอด (arthropod) เช่น แมงมุม tarantula (*Eurypelma californicum*) (Decker; et al. 1989: 511-523), แมงดาทะเล เช่น *Limulus polyphemus* ((Decker; et al. 2001: 17796-17799) และ *Tachypleus tridentatus* (Nagai; Osaki; & Kawabata. 2001: 27166-27170, Kurtz. 1999: 85-100), กุ้ง crayfish เช่น *Astacus leptodactylus* (Schneider; et al. 1986: 173-176) *Pacifastacus leniusculus* (Dolashka-Angelova; et al. 2005: 1207-1217, Lee; Lee; & Söderhäll. 2004: 490-496) ปู เช่น *Cancer magister* (Terwilliger ;& Brown. 1993: 1-13) กุ้ง เช่น *P. monodon* (Stoeva; et al. 2001: 416-422.) *M. japonicus* (Adachi; et al. 2001: 1130-1136) และ *L. vannamei* (Figuerola-Soto; et al. 1997: 203-208) hemocyanin มีบทบาทหลายอย่าง เมื่ออยู่ในรูปที่ไม่มีออกซิเจน (deoxy form) จะไม่มีสี แต่เมื่ออยู่ในรูปที่มีออกซิเจน (oxy form) hemolymph จะเป็นสีน้ำเงินอ่อน มีรายงานว่า hemocyanin ถูกสังเคราะห์จาก hepatopancreas (Spindler; Hennecke; & Gellissen. 1992: 248-253) ซึ่งสามารถยืนยันได้จากการทำ hybridization ใน *A. leptodactylus* (Gellissen; Hennecke; & Spindler. 1991: 194-195), ปู *Callinectes sapidus* (blue crab) (Rainer; & Brouwer. 1993: : 69-73) และ *P. semisulcatus* (Khayat; et al. 1995: 31-38)

โครงสร้างของ hemocyanin

hemocyanin ที่พบในสัตว์กลุ่มมอลลัสค์และอาร์โทรพอดมีโครงสร้างโมเลกุลต่างกัน (Van Holde; & Miller. 1995: 1-81, Salvato; & Beltramini. 1990: 1-47) ใน อาร์โทรพอด hemocyanin เกิดจากการรวมตัวของหน่วยย่อย ซึ่งมีมวลโมเลกุลของแต่ละหน่วยย่อยอยู่ในช่วง 72.5-79.5 กิโลดัลตัน (kDa) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 600-660 หน่วย (Markl. 1986: 90-115) hemocyanin ในอาร์โทรพอดแต่ละหน่วยย่อยประกอบด้วย 3 โดเมน โดยโดเมนที่ 1 มีโครงสร้างเป็นเกลียวแอลฟา (α -helix) 7-8 เกลียว อยู่ทางด้านปลาย N ของสายโพลีเปปไทด์ โดเมนที่ 2 เป็นตำแหน่งที่มีคอปเปอร์สองอะตอม คือ CuA และ CuB แต่ละอะตอมจับกับ ฮิสทีดีน (histidine) 3 หน่วย ในสายโพลีเปปไทด์ของ hemocyanin และเป็นตำแหน่งที่มีการจับกับออกซิเจน ส่วนโดเมนที่ 3 เป็นโครงสร้างแบบแผ่นบีตา (β -barrel) 7 ส่วนอยู่ทางด้านปลาย C ของสายโพลีเปปไทด์ ตัวอย่างของ hemocyanin หน่วยย่อยที่ 2 จาก *L. polyhemus* แสดงในภาพประกอบ 4

Limulus hemocyanin



ภาพประกอบ 4 โครงสร้างแบบตติยภูมิของ hemocyanin หน่วยย่อยที่ 2 จาก *L. polyhemus* สีส้มคือ Cu^{2+} , สีเขียวคือโดเมนที่ 1, สีน้ำเงินคือ โดเมนที่ 2, สีแดงคือโดเมนที่ 3

ที่มา: Decker, H. & Jaenicke, E. (2004). *Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins*. p. 674.

โครงสร้างพื้นฐานของ hemocyanin ในอาร์โทรพอดแต่ละหน่วยย่อยจะรวมกันเป็นแบบ hexamer มีมวลโมเลกุลประมาณ 450 กิโลดาลตัน (kDa) (Garcia-Carreño; et al. 2008: 6454-6459, Adachi; et al. 2005: 136–143, Decker; & Jaenicke. 2004: 673-687) จากการศึกษาคูโครงสร้างผลึก (crystallography) ใน *P. interruptus* (Volbeda; & Hol. 1989: 249-379) และ *L. polyphemus* (Hazes; et al. 1993: 597-619) และจากการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ศึกษาโครงสร้างของ hemocyanin ใน *E. californicum* (De Haas; & Van Bruggen. 1994: 464–478) และ *P. elephas* พบว่า hemocyanin จะรวมตัวกันเป็นกลุ่มขนาดใหญ่ซึ่งประกอบด้วย hexamer หลายหน่วยอยู่รวมกัน (aggregate) ขึ้นอยู่กับกลุ่มของสิ่งมีชีวิต เช่น เป็น 6-mer (1×6 , $M_r \sim 450$ kDa), 12-mer (2×6 , $M_r \sim 900$ kDa), 24-mer (4×6 , $M_r \sim 1800$ kDa) และ 48-mer (8×6 , $M_r \sim 3600$ kDa) (Van Holde; & Miller. 1995: 1-81, Salvato; & Beltramini. 1990: 1-47) แต่ละหน่วยของ hexamer ไม่ได้จับกันด้วยพันธะโควาเลนต์ Markl (1980) ได้ศึกษาเกี่ยวกับพันธะระหว่างหน่วยของ hexamer ของแมงมุม *Cupiennius salei* พบว่า hexamer 2 หน่วยอาจจับกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ รวมกันเป็น 12-mer ในสัตว์พวกมอลลัสค์พบว่า hemocyanin มีมวลโมเลกุลของหน่วยย่อยประมาณ 50 kDa (Lieb; et al. 2001: 4546-4551, Miller et al., 1998: 827-842) จากงานวิจัยของ Cuff และคนอื่น ๆ (1998) ได้ใช้รังสีเอกซ์ ศึกษาโครงสร้างของ hemocyanin ใน *O. doffleini* พบว่าโครงสร้างแบบตติยภูมิโดยประกอบด้วย 2 โดเมน โดยทั้งสองโดเมนนี้เหมือนกับโดเมนที่ 2 และ 3 ของ hemocyanin ในอาร์โทรพอด โดยตำแหน่งของคอปเปอร์ที่จับกับออกซิเจนอยู่ที่โดเมนที่ 1 ซึ่งเป็นด้านปลาย N ของสายโพลีเปปไทด์ ส่วนโดเมนที่ 2 เป็นด้านปลาย C ของสายโพลีเปปไทด์ที่เป็นแผ่น β (Van Holde; Miller; & Decker. 2001: 15563-15566)

มวลโมเลกุลของ hemocyanin

มวลโมเลกุลของ hemocyanin บริสุทธิ์ในรูปแบบปกติ (native form) จากสิ่งมีชีวิตหลายๆ ชนิดจะมีมวลโมเลกุลแตกต่างกัน เช่น *L. vannamei* มีมวลโมเลกุล 400 kDa (Figuerola-Soto; et al. 1997: 203-208) *P. setiferus* (Brouwer; Bonaventura; & Bonaventura. 1978: 2148-2154) และ *P. monodon* มีมวลโมเลกุลเท่ากันคือ 471 kDa (Ellerton; & Anderson. 1981: 159-165) ส่วน hemocyanin บริสุทธิ์ของปู *Scylla olivacea* มีมวลโมเลกุล 400 kDa (Chen; et al. 2007: 194-202) จำนวนและมวลโมเลกุลของหน่วยย่อยของ hemocyanin ที่ทำให้บริสุทธิ์จากสิ่งมีชีวิตหลายๆ ชนิด จะมีจำนวนและมวลโมเลกุลของหน่วยย่อยต่างกัน เช่น hemocyanin ที่มีหน่วยย่อย 2 หน่วย ตัวอย่างเช่น *P. japonicas* มีมวลโมเลกุล 77 และ 67 kDa (Adachi; et al. 2001: 1130-1136) *P. vannamei* มีมวลโมเลกุล 82 และ 75 kDa (Figuerola-Soto; et al. 1997:

203-208) *P. setiferus* มีมวลโมเลกุล 82 และ 77 kDa (Brouwer; Bonaventura; & Bonaventura. 1978: 2148-2154) *P. leniusculus* มีมวลโมเลกุล 75 และ 66 kDa (Lee; Lee; & Söderhäll. 2004: 490-496, Dolashka-Angelova; et al. 2005: 1207-1217) และ giant isopod (*Bathynomus giganteus*) มีมวลโมเลกุล 72 และ 70 kDa (Pless; et al. 2003:402-410) สำหรับ hemocyanin ที่มีหน่วยย่อย 3 หน่วย เช่น hemocyanin ของ *P. monodon* มีมวลโมเลกุล 85 ,77 และ 70 kDa (Ellerton; & Anderson. 1981: 159-165) และ hemocyanin ของ *C. japonica* มีมวลโมเลกุล 80, 75 และ 70 kDa (Fan; et al. 2009: 144-149) เป็นต้น

การทำ hemocyanin ให้บริสุทธิ์

โดยทั่วไปการทำให้ hemocyanin บริสุทธิ์จาก hemolymph สามารถทำได้โดยการทำ ultracentrifugation และ gel filtration chromatography (Sanders; et al. 1992: 511-516) เนื่องจาก hemocyanin เป็นโปรตีนที่พบมากใน hemolymph ประมาณร้อยละ 90-95 ของโปรตีนทั้งหมด การทำ ultracentrifugation และคอลัมน์ Sepharose CL – 6B สามารถทำให้ hemocyanin บริสุทธิ์จาก hemolymph ของ *P. japonicus* และตรวจหา hemocyanin ได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร (nm) (Adachi; et al. 2001: 1130-1136) ซึ่งมีขั้นตอนเหมือนกับ การทำให้ hemocyanin บริสุทธิ์จาก hemolymph ของ *P. vannamei* (Garcia-Carreño; Cota; & Navarrete Del Toro. 2008: 6454-6459) สำหรับ *P. leniusculus* ได้มีการทำให้ hemocyanin บริสุทธิ์โดยการทำ ultracentrifugation จากนั้นผ่านคอลัมน์ Sephacryl S-200 (Lee; Lee; & Söderhäll. 2004: 490-496)

บทบาททางชีวภาพของ hemocyanin

hemocyanin เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่หลายอย่าง (multifunctional) โดยทั่วไปเป็นที่ทราบกันว่า hemocyanin ทำหน้าที่ขนส่งออกซิเจนของสัตว์ในกลุ่มมอลลัสก์และอาร์โทรพอด เมื่อคอปเปอร์จับกับออกซิเจนทำให้ hemolymph กลายเป็นสีน้ำเงิน (Van Holde; & Miller. 1995: 1-81)

จากการที่มีรายงานวิจัยว่ากรดอะมิโนทางด้านปลาย N ของ hemocyanin มี activity ของเอนไซม์ phenol oxidase โดย hemocyanin ถูกกระตุ้นให้มี activity หรือเปลี่ยนไปเป็นเอนไซม์ phenol oxidase ได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารหลายอย่าง เช่น sodium dodecyl sulfate (SDS) เป็นต้น ดังนั้น SDS จึงถูกใช้เป็นตัวกระตุ้นปฏิกิริยาที่ใช้ในการหาค่า activity ของเอนไซม์ phenol oxidase ในพืช เช่น เห็ด (*Agaricus bisporus*) (Espin; & Wichers. 1999: 3518-3525) ในสัตว์ เช่น

P. californiensis (Gollas-Galvan; Hernández-López; Vargas-Albores. 1999: 77-82) *T. tridentatus* (Kurtz. 1999: 85-100) *P. leniusculus* (Lee; Lee; & Söderhäll. 2004: 490-496)

ในปี 2001 Destoumieux-Garzon และคนอื่นๆ รายงานว่า กรดอะมิโนทางด้านปลาย C ของ hemocyanin มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์เนื่องจากสามารถแยกโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราจาก hemolymph ของกุ้ง *L. vanamei* (PvHCt; มวลโมเลกุล 2.7 kDa) และ *P. stylirostris* (PsHCt1; มวลโมเลกุล 7.9 kDa, PsHCt2; มวลโมเลกุล 8.3 kDa) โดยโปรตีนที่แยกได้มีความเหมือนกับสายเปปไทด์ด้านปลาย C ของ hemocyanin ในกุ้งตระกูล Penaeid สูงถึงร้อยละ 95-100 (Destoumieux-Garzon; et al. 2001: 47070-47077)

การศึกษา hemocyanin

ในปี 1992 Neuteboom และคนอื่นๆ ได้ศึกษา hemocyanin ใน *P. interruptus* พบว่า hemocyanin มีการรวมตัวเป็นแบบ hexamer ที่มีหน่วยย่อย 4 แบบ คือ a, b, b' และ c และเมื่อโคลนยีน hemocyanin หน่วยย่อย c ที่มีจำนวนกรดอะมิโน 661 หน่วย มวลโมเลกุล 80 kDa มีตำแหน่งของคอปเปอร์สองอะตอมและมีตำแหน่งที่เติมคาร์โบไฮเดรต (glycosylation site) ที่ตำแหน่งที่ 476 (Asn₄₇₆-Asn-Thr) ในโดเมนที่ 3 ของหน่วยย่อย c ซึ่งสามารถบ่งบอกได้ว่า hemocyanin ชนิดนี้เป็นไกลโคโปรตีน เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของหน่วยย่อย c ไปเปรียบเทียบกับ hemocyanin หน่วยย่อย a ในกุ้งชนิดเดียวกัน พบว่ามีค่าความเหมือนร้อยละ 59 จากการศึกษาสมบัติของโปรตีนพบว่ามีตำแหน่งตัด (cleavage site) โดยเอนไซม์ protease ที่สายโพลีเปปไทด์ หน่วยย่อย c ตำแหน่ง Pro₁₄₈-His₁₄₉ (Neuteboom; Jekel; & Beintema. 1992: 243-249)

ในปี 1997 Durstewitz และ Terwilliger ได้ศึกษา hemocyanin ใน *C. magister* พบว่า hemocyanin มีการรวมตัวเป็นแบบ hexamer ที่มีหน่วยย่อย 6 หน่วย จึงทำการโคลนยีน hemocyanin หน่วยย่อยที่ 6 (Cmag6) โดยใช้ cDNA library ที่เตรียมจากตับ (hepatopancreas) เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ สามารถโคลนยีน Cmag6 ความยาว 1,939 คู่เบส (bp) แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนที่มีความยาว 650 หน่วย มีมวลโมเลกุล 74.9 kDa และมีตำแหน่งที่เติมคาร์โบไฮเดรตที่กรดอะมิโนตำแหน่ง 600 บ่งชี้ว่า hemocyanin ชนิดนี้เป็นไกลโคโปรตีน (Durstewitz; & Terwilliger. 1997: 266-276)

ต่อมาในปีเดียวกัน Sellos และคนอื่นๆ (1997) ได้ศึกษายีน hemocyanin ของ *P. vannamei* จาก cDNA library ที่เตรียมจากตับ พบว่ายีน hemocyanin มีความยาว 2,095 bp แปลรหัสเป็นสายโพลีเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 648 หน่วย มีมวลโมเลกุล 73.57 kDa แต่ไม่พบตำแหน่งการเติมคาร์โบไฮเดรตภายในยีน hemocyanin และยีนที่แยกได้นี้มีความเหมือนกับยีน hemocyanin จาก *P. interruptus* มาก (Sellos; Lemoine; & Wormhoudt. 1997: 153-158)

ในปี 2004 Lee และคนอื่นๆ ได้ศึกษายีน *hemocyanin* ของ *P. leniusculus* โดยโคลนยีน *hemocyanin 2* ที่แปลรหัสให้กรดอะมิโน 687 หน่วย มีมวลโมเลกุล 78.37 kDa พบว่ามีความเหมือนร้อยละ 59 เมื่อเทียบกับ *hemocyanin 1* (GenBank AF522504) และ มีความเหมือนร้อยละ 29 เมื่อเทียบกับยีนของเอนไซม์ poephenol oxidase ของกุ้งนางชนิดเดียวกัน (GenBank X83494) รวมทั้งมีความเหมือนสูงถึงร้อยละ 68 เมื่อเทียบกับ *hemocyanin 4* ของ *P. elephas* (GenBank CAD 56697) (Lee; Lee ; & Söderhäll. 2004: 490-496)

ในปีเดียวกัน Zhang และคนอื่นๆ ได้พยายามที่จะหาโปรตีนต้านไวรัสโดยใช้ affinity chromatography พบ โปรตีน 2 ชนิดที่แยกได้จาก *P. monodon* มีมวลโมเลกุล 73 และ 75 kDa ซึ่งแยกมาพร้อมกับเชื้อ WSSV และเมื่อใช้ mass spectrometry วิเคราะห์พบว่าคือโปรตีน *hemocyanin* จึงสรุปว่า *hemocyanin* ทำหน้าที่ในการป้องกันการบุกรุกของไวรัส (antiviral defense) โดยจะจับกับ WSSV (Zhang; Huan.; & Qin. 2004: 93–99)

ในปี 2005 Hagner – Holler และคนอื่นๆ รายงานว่า *hemocyanin* ของ amphipod *Gammarus roeseli* มีโครงสร้างเป็น hexamer และสามารถโคลนยีน *hemocyanin* ได้ขนาด 2,150 bp แปลรหัสเป็นสายโพลีเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 672 หน่วย มีมวลโมเลกุล 76.3 kDa (Hagner–Holler; et al. 2005: 445-452) นอกจากนี้มีรายงานว่าพบการแสดงออกของ *hemocyanin* เพิ่มขึ้นในกุ้ง *P. japonicus* ที่สามารถต้านทานต่อเชื้อ WSSV (WSSV-resistant shrimp) (Pan; et al. 2005: 103–112) ต่อมาในปี 2007 Lei และคนอื่นๆ ศึกษา *hemocyanin* ในกุ้ง *P. japonicus* โดยทำ *hemocyanin* ของกุ้ง *P. japonicus* ให้บริสุทธิ์จากนั้นนำไปบ่มกับไวรัส WSSV จำนวน 10^8 อนุภาคต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปฉีดกุ้งพบว่าอัตราการ replication ของ WSSV ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และสามารถโคลนยีนของหน่วยย่อย *hemocyanin* จาก *P. japonicus* ได้ 2 ยีน คือ *PjHcL* และ *PjHcY* ซึ่งแปลเป็นกรดอะมิโนขนาด 678 และ 644 หน่วย มีมวลโมเลกุล 75 และ 73 kDa ตามลำดับ ซึ่งพบว่าระดับการ transcription ของ *PjHcL* มีการแสดงออกสูงขึ้นหลังจากติดเชื้อ WSSV (Lei; et al. 2007: 808-813) สอดคล้องกับการวิเคราะห์ยีนจาก hemocyte ของ *P. monodon* ที่ติดเชื้อ yellow head virus (YHV) ด้วยวิธีทาง proteomics ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปลาย C ของ *hemocyanin* จะมีการแสดงออกสูงขึ้นเมื่อติดเชื้อ (Bourchoukarn; et al. 2008: 504–511)

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง hemocyanin กับเอนไซม์ phenol oxidase

hemocyanin มีความสัมพันธ์กับเอนไซม์ phenol oxidase ในด้านความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน สมบัติทางเคมี ทางกายภาพและมีหน้าที่คล้ายกัน (Lee; Lee; & Söderhäll. 2004: 490-496, Pless; et al. 2003: 402-410) hemocyanin และเอนไซม์ phenol oxidase เป็นโปรตีนที่มี Cu^{2+} เป็นองค์ประกอบเช่นเดียวกัน พบได้ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน เช่น *P. japonicas* (Adachi; et al. 2001: 1130-1136) แต่เอนไซม์ phenol oxidase ยังพบในพืช เช่น แครอท (*Daucus carota*) (Carlberg; & Söderhäll. 1985: 295-298) รากและใบของข้าวโพด (*Zea mays*) (Adamia; et al. 2006: 136-145)

เอนไซม์ phenol oxidase มีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองของครัสเตเชียนโดยเป็นเอนไซม์ที่สังเคราะห์เมลานินเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่บุกรุกได้ (Söderhäll; & Cerenius 1998: 23-28) โปรตีนใน hemolymph ของสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนมีปริมาณ hemocyanin มากถึงร้อยละ 80 – 95 ในขณะที่พบปริมาณของเอนไซม์ phenol oxidase น้อยมาก (Van Holde; & Miller. 1995: 1-81, Adachi; et al. 2001: 1130-1136) มีรายงานวิจัยพบว่าสาย โพลีเปปไทด์ด้านปลาย N ของ hemocyanin มี activity ของเอนไซม์ phenol oxidase เช่น *E. californicum* (Decker; & Rimke. 1998: 25889-25892) *T. tridentatus* (Nagai; Osaki; & Kawabata. 2001: 27166-27170) และ deep – sea crustacean *Bathynomus giganteus* (Pless; et al. 2003: 402-410) hemocyanin ถูกกระตุ้นให้มี activity หรือเปลี่ยนไปเป็นเอนไซม์ phenol oxidase ได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ทริปซิน, perchlorate และ SDS และสารภายในสัตว์เอง (endogenous) เช่น clotting factor และ anti-bacterial peptide ต่างๆ และมีรายงานการวิจัยในปี 1995 ที่ได้จากการศึกษาเอนไซม์ proPo จาก *P. leniusculus* (Aspan; et al. 1995: 932-943), *D. melanogaster* (Fujimoto; et al. 1995: 7769-7773) และ *Manduca sexta* (Hall; et al. 1995: 7764-7768) พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับลำดับกรดอะมิโนของ hemocyanin มาก และในปี 2004 Lee และคนอื่นๆ ได้ทำการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของ hemocyanin และเอนไซม์ proPo จาก *P. leniusculus* พบว่า hemocyanin 1 (GenBank AF522504) มีความเหมือน (identities) ร้อยละ 31 และ hemocyanin 2 (GenBank AY193781) มีความเหมือนร้อยละ 29 กับเอนไซม์ proPo (GenBank X83494) ของ *P. leniusculus* (S. Y. Lee; B. L. Lee ; & Söderhäll. 2004: 490-496)

ในปี 2551 อัจฉริยะ และคนอื่นๆ ได้โคลน cDNA ของ hemocyanin บางส่วน (pHC) จาก cDNA library ของตั๊กแตนเข้บ้วย *F. merguensis* โดยวิธี PCR พบว่า cDNA ที่โคลนได้มีขนาด 1,496 bp แปลรหัสให้กรดอะมิโนขนาด 498 หน่วย ลำดับกรดอะมิโนของยีน pHC มีความเหมือนกับยีน hemocyanin จากกุ้งขาว *L. vannamei* สูงถึงร้อยละ 91 กุ้ง *M. japonicus* ร้อยละ 81 และ 88 และกุ้ง *F. chinensis* ร้อยละ 80 นอกจากนี้ยังพบว่า hemocyanin ของตั๊กแตนเข้บ้วยมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับยีนสำหรับ poephenol oxidase ของกุ้ง *P. semisulcatus* ร้อยละ 34, กุ้งขาว

L. vannamei ร้อยละ 33 และกุ้ง *M. japonicas* ร้อยละ 32 บ่งชี้ว่า hemocyanin และ proPo ใน hemolymph ของกุ้ง *Penaeus* มีความเกี่ยวข้องกัน (อาจารย์ เจียวกิก. 2551)

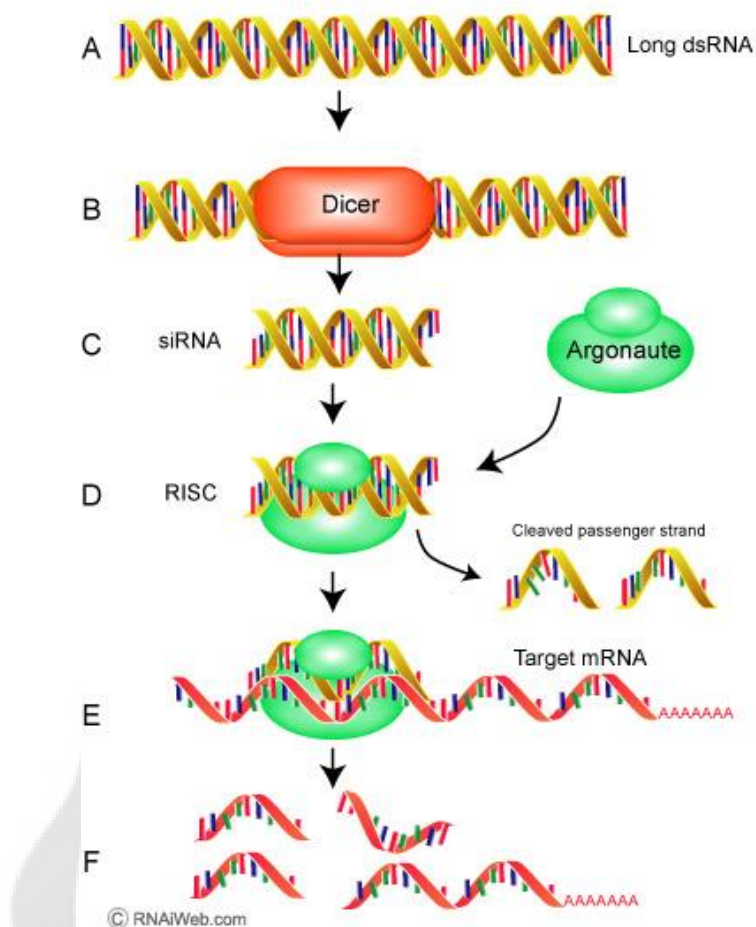
การควบคุมการแสดงออกของยีนโดยเทคโนโลยี RNA interference (RNAi)

กระบวนการ RNAi เป็นการควบคุมการแสดงออกของยีนในขั้นตอน post-transcriptional processing ของ mRNA ซึ่งจากการศึกษาการควบคุมการแสดงออกของยีนโดยกระบวนการ RNAi ที่เกิดภายในเซลล์ของคนและสัตว์หลายชนิดพบว่ามีการกลไกคล้ายกันโดยจีโนมมีการกำหนดการสร้างโมเลกุลอาร์เอ็นเอขนาดเล็กที่เรียกว่า micro RNA (miRNA) ซึ่งเป็น double-stranded RNA (dsRNA) เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการย่อยสลายของอาร์เอ็นเอเป้าหมาย (mRNA target) และเป็นจุดเริ่มต้นในการกระตุ้นกลไกการทำงานของ RNAi ในการขัดขวางการสร้างโปรตีน RNAi จึงมีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของยีน และมีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมลักษณะทางพันธุกรรม ควบคุมการทำงานของเซลล์ รวมถึงพัฒนาการของสิ่งมีชีวิต (Fire A. 1999: 358-363)

กระบวนการทำงานของ RNAi

เอนไซม์ dicer จัดเป็น RNaseIII nuclease ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น dsRNA-specific endonuclease สามารถจดจำและจับ dsRNA ที่มีความคล้ายคลึง (homologue) กับ mRNA เป้าหมาย และสามารถตัดสาย dsRNA ออกเป็นสายสั้นๆ ที่เรียกว่า small interfering RNA (siRNA) ที่มีความยาวประมาณ 21-25 bp จากนั้นโปรตีน Argonaute จะเข้ามาจับ siRNA ดังกล่าว เกิดเป็น ribonucleoprotein complex (RNP) และเหนี่ยวนำให้โปรตีนชนิดอื่นเข้ามารวมกันเพื่อสร้างเป็น RNA-induced silencing complex (RISC) ซึ่ง RISC จะทำการแยก siRNA สายคู่ ออกเป็นสายเดี่ยว โดยสายเดี่ยวที่เป็น antisense ของ siRNA จะมีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับ mRNA เป้าหมาย (sense) จึงเป็นตัวกำหนดความจำเพาะและการจดจำให้ RISC complex เข้าจับและทำลาย mRNA เป้าหมายได้อย่างแม่นยำ ซึ่ง RISC ที่มี siRNA สายเดี่ยวรวมอยู่ด้วย (RISC complex) จะเข้าจับกับ mRNA เป้าหมายโดยอาศัยลำดับเบสคู่สมระหว่าง siRNA และ mRNA เป้าหมาย จากนั้น RISC complex จะกระตุ้นให้ RNase ทำลาย mRNA (ภาพประกอบ 5)

mRNA ที่ถูกย่อยจะถูกทำลาย เป็นผลให้ไม่มี mRNA ผ่านเข้าสู่กระบวนการแปลรหัสไปเป็นโปรตีน ทำให้ไม่มีการสร้างโปรตีนจากยีนนั้นเกิดขึ้น การทำงานของ RNAi จึงเป็น post-transcriptional regulation of gene expression หรือ post-transcriptional gene silencing (Fire A. 1999: 358-363)



ภาพประกอบ 5 กระบวนการทำงานของ RNAi

ที่มา: Fire Andrew.; et al. (1998). *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. p. 806-811.

การประยุกต์ใช้เทคโนโลยี RNAi

ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคโนโลยี RNAi มาใช้ประโยชน์อย่างหลากหลาย โดยอาศัยหลักในการนำ dsRNA หรือ siRNA เข้าสู่สิ่งมีชีวิต (transfection) เพื่อกระตุ้นกลไกการทำงานของ RNAi (Genc; Koroglu; & Genc. 2004: 260-270) ซึ่งรูปแบบของ dsRNA หรือ siRNA ที่นำเข้าสู่ร่างกายมีอยู่ 5 ชนิด คือ 1) รูปแบบของ dsRNA สังเคราะห์สายยาว 2) รูปแบบของ dsRNA สังเคราะห์ที่ผ่านการตัดโดย dicer เป็น siRNA 3) รูปแบบของ dsRNA ที่ผ่านการถอดรหัสจากดีเอ็นเอในหลอดทดลองและใช้ dicer ตัดเป็น siRNA 4) รูปแบบของ siRNA expression vector และ 5) รูปแบบของ PCR derived siRNA cassette (มหาวิทยาลัยมหิดล. สถาบันอณูชีววิทยาและพันธุศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2552: 6-8)

การนำเทคโนโลยี RNAi ไปใช้ในการศึกษาวิจัย

เทคโนโลยี RNAi จัดว่าเป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์มากต่อการนำมาใช้เพื่อศึกษาหน้าที่ของยีน เพื่อนำความรู้เหล่านั้นไปประยุกต์ใช้ในสาขาวิชาต่างๆ เหตุผลที่วิธีการนี้มีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายและมีความนิยมเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เพราะการยับยั้งการแสดงออกของยีนด้วยวิธีการอื่นๆ เช่น 'gene knock-out' ต้องทำให้โครงสร้างของยีนเปลี่ยนแปลงไป อาจทำให้ยีนที่อยู่ในตำแหน่งนั้น หรือตำแหน่งข้างเคียงเสียหาย และอาจส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตนั้นๆ แต่ด้วยเทคโนโลยี RNAi สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนหลังจากกระบวนการถอดรหัส ดังนั้นจึงไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรม ของสิ่งมีชีวิต (Mary; Maningas; & Maria. 2015: 123-134)

การผลิตอาร์เอ็นเอสายคู่

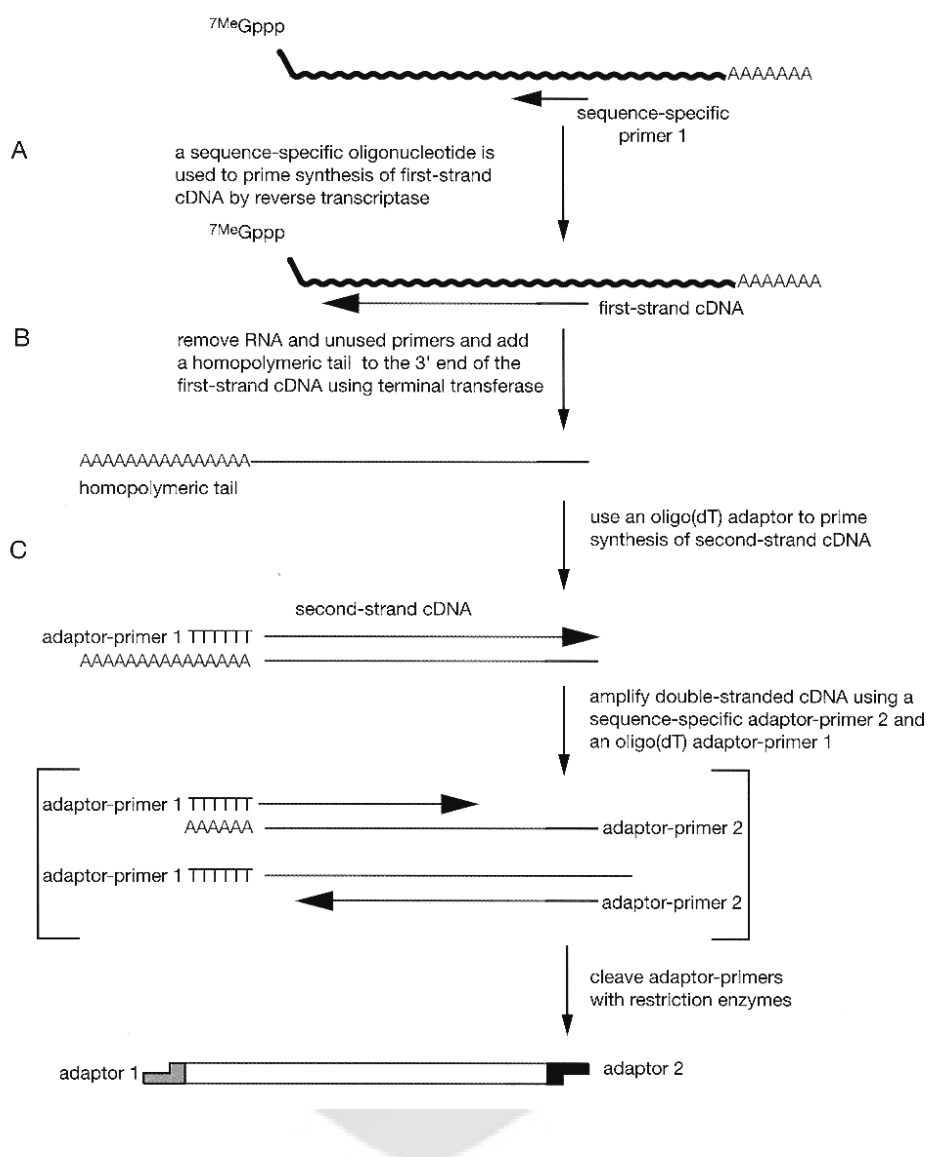
อาร์เอ็นเอสายคู่ขนาดยาว สามารถผลิตได้โดย 2 วิธีหลักๆ คือ

1. *In vitro* transcription เป็นการผลิตอาร์เอ็นเอสายคู่ในหลอดทดลอง ซึ่งเลียนแบบการสร้างอาร์เอ็นเอในสิ่งมีชีวิต ในปฏิกิริยาประกอบด้วยต้นแบบสายดีเอ็นเอ (DNA template), ไรโบนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ตัว ได้แก่ rGTP, rUTP, rATP, rCTP, สารละลายบัฟเฟอร์ (transcription buffer) และเอนไซม์ RNA polymerase โดยทั่วไปแล้วบริเวณของยีนที่ต้องการนำมาสร้างสายอาร์เอ็นเอจะถูกโคลนเข้าพลาสมิดซึ่งมี T7, Sp6 หรือ T3 RNA polymerase promoter เช่น pGEM-series vectors, pBluescript vector เป็นต้น การโคลนอาจโคลนเข้าเพียงสาย sense สายเดียว หรือโคลนในลักษณะเป็น hairpin ที่มีทั้งสาย sense และ antisense โดยมี loop เชื่อมอยู่ตรงกลาง นอกจากนี้ต้นแบบดีเอ็นเอสายตรงอาจได้มาจากการทำ PCR โดยออกแบบ primer ให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ T7 RNA polymerase promoter ต่อกับส่วนของ 5 end ของ forward primer ของสายที่จะสร้างอาร์เอ็นเอสาย sense หรือต่อกับ forward primer ของสายที่จะสร้างอาร์เอ็นเอสาย antisense การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสายตรงโดยวิธีพีซีอาร์นั้นทำได้รวดเร็วและได้ปริมาณมาก (มหาวิทยาลัยมหิดล. สถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2552: 6-8)
2. *In vivo* bacterial expression เป็นการผลิตอาร์เอ็นเอสายคู่ในเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งเซลล์แบคทีเรียโดยทั่วไปจะมีเอนไซม์ Ribonuclease III (RNaseIII) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ตัดอาร์เอ็นเอสายคู่ ดังนั้นการสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ในเซลล์แบคทีเรียจึงใช้ *E. coli* สายพันธุ์ HT115 ที่มีคุณสมบัติจำเพาะคือเป็นแบคทีเรียที่มีความบกพร่องของยีนที่สร้างเอนไซม์ RNaseIII *E. coli* สายพันธุ์นี้ได้ถูกตัดแต่งพันธุกรรมให้สามารถสร้าง T7 RNA polymerase หลังถูกกระตุ้นด้วย IPTG inducible promoter ดังนั้นอาร์เอ็นเอสายคู่จะถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์แบคทีเรียโดยการเหนี่ยวนำด้วย IPTG พลาสมิดที่ใช้ควรเป็น expression plasmid ที่มี T7 RNA polymerase promoter เช่น pET series vector ยีนที่จะนำมาสร้างอาร์เอ็นเออาจโคลนเป็นลักษณะ hairpin ที่ประกอบด้วยสาย sense-loop และสาย antisense หรือเป็นโคลนที่เป็นสาย sense หรือสาย antisense แยกกันก็ได้ (มหาวิทยาลัยมหิดล. สถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2552: 6-8)

เทคนิค Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

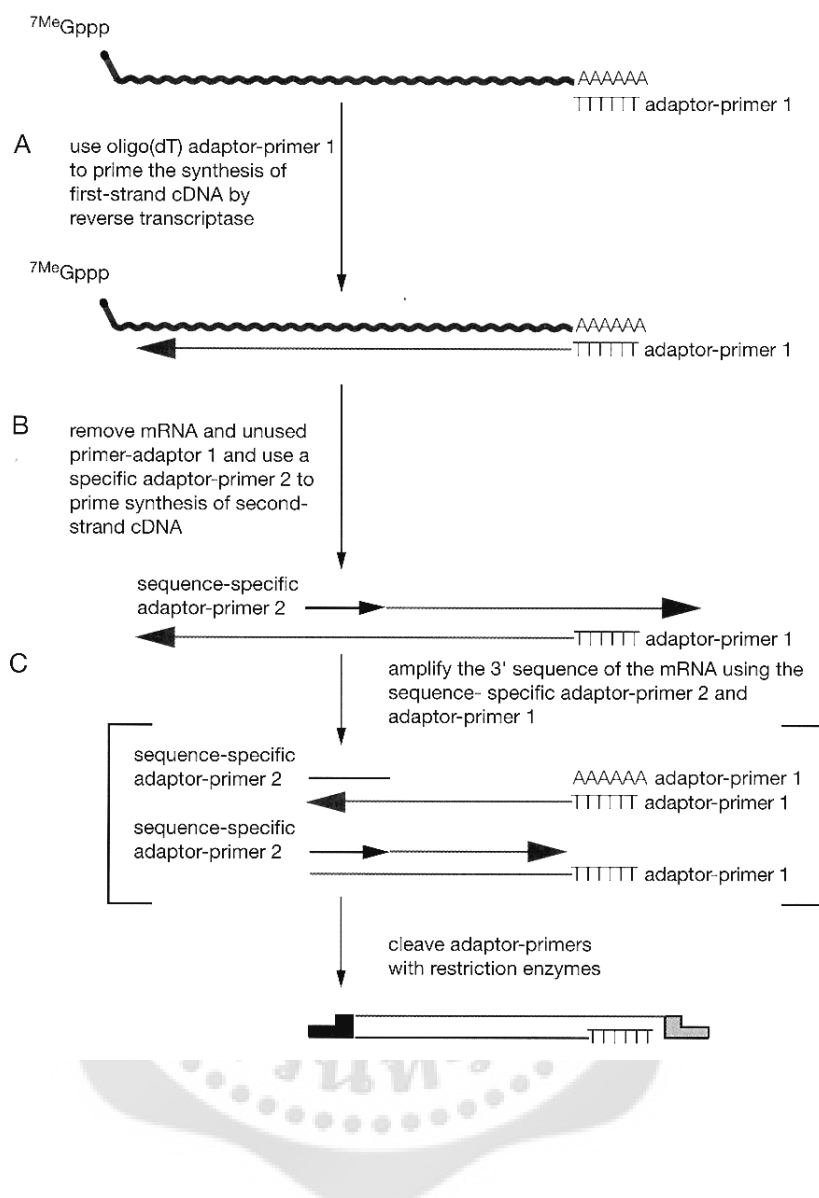
การแยก cDNA โดยใช้ degerate primers จะทำให้ได้ cDNA บางส่วนซึ่งยังไม่ครบสมบูรณ์ เทคนิคหนึ่งที่ใช้ในการหาลำดับข้อมูลของ cDNA ทางปลาย 5' คือ เทคนิค 5'-RACE โดยขั้นตอนแรกจะใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณที่ทราบลำดับดีเอ็นเอที่เป็นจุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์ cDNA จาก mRNA ต้นแบบโดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase จากนั้นกำจัด mRNA และเติมนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3' (homopolymeric tail) ของ cDNA เส้นแรกที่สังเคราะห์ขึ้นโดยใช้เอนไซม์ terminal transferase ในภาพประกอบ 6 เป็นการเติม A เข้าที่ปลาย จากนั้นใช้ oligo (dT) adaptor เป็นจุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์ cDNA เส้นที่สอง ดีเอ็นเอทั้งสองเส้นสามารถนำมาใช้เป็นต้นแบบในการทำ PCR โดยใช้ oligo (dT) adaptor และไพรเมอร์ตัวที่สองที่จำเพาะกับบริเวณที่ทราบลำดับดีเอ็นเอ

ในลักษณะเดียวกันการแยก cDNA ทางปลาย 3' สามารถทำได้โดยใช้ oligo (dT) adaptor ในการสังเคราะห์ cDNA เส้นแรก โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase จากนั้นกำจัด mRNA ออก และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณที่ทราบลำดับดีเอ็นเอในการสังเคราะห์ cDNA เส้นที่สอง ดีเอ็นเอทั้งสองเส้นสามารถนำกลับมาใช้เป็นต้นแบบในการทำ PCR โดยใช้ oligo (dT) adaptor และไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณที่ทราบลำดับดีเอ็นเอ (ปรินท์ ชัยวิสุทธิทางกูร. 2551: 198-199) (ภาพประกอบ 7)



ภาพประกอบ 6 เทคนิค 5' RACE

ที่มา: Sambrook J.; & Russell D. W. (2001). *Molecular cloning: Cold spring Harbor laboratory Press (Third Edition)*.



ภาพประกอบ 7 เทคนิค 3' RACE

ที่มา: Sambrook, J.; & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: Cold spring Harbor laboratory Press (Third Edition)*.

การแยกยีน *Toll receptor (MrToll)* และ *hemocyanin (MrHC)* ในกุ้งก้ามกราม

ปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับยีน *Toll receptor* และ *hemocyanin* ในกุ้งชนิดต่างๆ ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น แต่ยังไม่มียีนเกี่ยวกับยีน *Toll receptor (MrToll)* และ *hemocyanin (MrHC)* ในกุ้งก้ามกราม ดังนั้นการศึกษาวิจัยนี้จึงทำ PCR เพื่อหาลำดับดีเอ็นเอบางส่วนของยีน *MrToll* และ *MrHC* โดยออกแบบ degenerate primers สำหรับหาลำดับดีเอ็นเอของยีนทั้งสองจากการเปรียบเทียบบริเวณอนุรักษ์ (conserved regions) ของโปรตีน Toll และ hemocyanin ของกุ้งชนิดต่างๆ เมื่อได้ลำดับดีเอ็นเอบางส่วนแล้วจึงทำการหาข้อมูลดีเอ็นเอทางปลาย 5' และ ปลาย 3' โดยใช้เทคนิค RACE เพื่อให้ได้ข้อมูลของยีนที่ครบสมบูรณ์

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาวิจัยแรกของยีนทั้งสองในกุ้งก้ามกรามเพื่อเป็นการเตรียมความพร้อมด้านข้อมูลของยีนและโปรตีน และคาดว่าความเข้าใจเกี่ยวกับการแสดงออกและหน้าที่ของยีน โดยการใช้เทคนิคต่างๆ จะช่วยให้เข้าใจถึงบทบาทและหน้าที่ของโปรตีน MrToll และ MrHC ในกุ้งก้ามกรามได้ดียิ่งขึ้น อันจะนำไปสู่การป้องกันการติดเชื้อต่าง ๆ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในอนาคต



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เชื้อไวรัสและแบคทีเรีย

ไวรัส MNV

A. caviae (AHHRI 06103) ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมประมง

เชื้อแบคทีเรียที่ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาชีววิทยา

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ มีดังนี้

E. coli XL1-blue, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* M15,

Staphylococcus aureus ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11787,

B. megaterium, *B. subtilis* , *Vibrio vulnificus* DMST 27426 *V. harveyi* DMST

1526, *V. mimicus* DMST 27430, *V. parahaemolyticus* DMST 22093, *A. veronii*

DMST 21255, *A. hydrophila* DMST 22095

2. สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง

กึ่งก้ามกรามขนาด 40 กรัม

กึ่งก้ามกรามขนาด 1 กรัม

3. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

ตาราง 1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง		บริษัท
1.1	เครื่อง thermal cycler	Eppendorf
1.2	เครื่อง electrophoresis apparatus และ อุปกรณ์	Bio-Rad
1.3	เครื่อง shaking incubator	Gibthai
1.4	7300 Real-Time PCR System	Applied Biosystems

4. เคมีภัณฑ์

ตาราง 2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
2.1 ชุด Platinum [®] Taq DNA Polymerase	Invitrogen
2.2 ชุด GoScript [™] Reverse Transcriptase และ GoTaq [®] qPCR Master Mix	Promega
2.3 เอนไซม์ตัดจำเพาะ	New England Biolabs, Promega
2.4 T4 DNA ligase	Vivantis
2.5 ชุด SuperScript III First-Strand Synthesis	Invitrogen
2.6 TRIzol Reagent	Invitrogen
2.7 ชุด MinElute gel extraction kit	Qiagen
2.8 ชุด QIAprep [®] Spin Miniprep kit	Qiagen
2.9 ยาปฏิชีวนะ (ampicillin, kanamycin)	Sigma
2.10 ชุด SMARTer RACE cDNA Amplification kit	Clontech
2.11 ชุด 50x Advantage2 Polymerase Mix	Clontech
2.12 ชุด Nucleospin RNA XS kit 2.13	Macherey-Nagel
2.14 ชุด SuperScript III One-Step RT-PCR System	Invitrogen
2.15 ชุด Geneaid Plasmid Midi kit	Geneaid
2.16 T7 RNA polymerase	Promega
2.17 DNase I	Fermentas
2.18 RNaseA	Fermentas
2.19 ShortCut RNase III	New England Biolabs
2.20 agrose	Amresco

5. ชนิดของพลาสมิด

ตาราง 3 ชนิดของพลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง

ชนิดของพลาสมิด	Feature
3.1 pCR 2.1 vector (Invitrogen)	P_{lac} , $lacZ\alpha$ gene, Multiple cloning site, T7 promoter, M13 Forward (-20) priming sites, M13 Reverse priming sites, Kan^r , Amp^r , f1 origin และ pUC origin
3.2 pGEM-T Easy Vector (Promega)	T7 RNA polymerase transcription initiation site, Multiple cloning site, SP6 RNA polymerase promoter, SP6 RNA polymerase transcription initiation site, pUC/M13 Reverse priming sites, pUC/M13 Forward priming sites, $lacZ\alpha$ gene, f1 region, T7 RNA polymerase promoter
3.3 pQE-30 vector (Qiagen)	T5 promoter/lac operator element, T5 transcription, 6xHis-tag coding sequence, Multiple cloning site, Lambda t_0 transcriptional termination region, rrnB T1 transcriptional termination region, ColE1 origin of replication, β -lactamase coding sequence

6. ลำดับดีเอ็นเอของ primer

ตาราง 4 ลำดับดีเอ็นเอของ primer ที่ใช้ในการทดลองจากบริษัท 1st Base

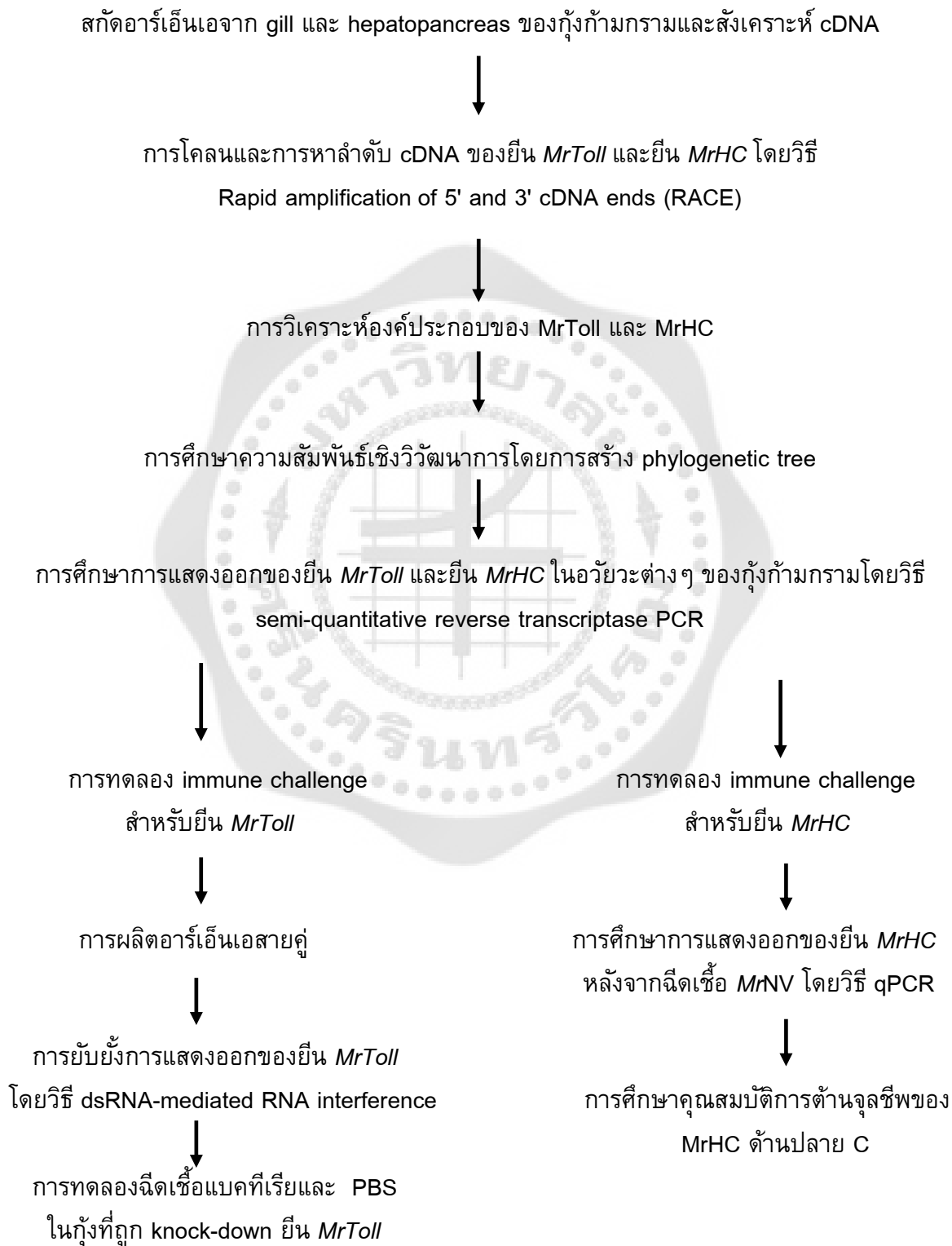
Primer	Primer sequence (5'-3')	ผลผลิต PCR (bp)
หาลำดับ cDNA <i>MrToll</i>		
TIR-F	TGYCTYCACTAYCGYGA CTG	96
Toll-R1.5	TGARAGCACSA CAATRG T	
Toll-F6	AAYCTRACMATTCCMWACAA	627
Nested 5'-RACE	CTGATTTTGAATGTACTCTCCAGGTACC	
5'-RACE <i>MrToll</i>		
Nested2Toll 5'-RACE	ACAGTCACAGTCCCATGGATTTCAC	3,000
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGT ATCAACGCAGAGT	
NToll-600R	CCTCTGACATCTAGAACC	2,500
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	
3'-RACE <i>MrToll</i>		
N2Toll 3'-RACE	CACAGTTTTTGGTCCCTGGGCTTGAA	1,500
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGT ATCAACGCAGAGT	
วิเคราะห์การแสดงออก		
MrTollexp-F	AGTGGAAATCCATGGGACTG	200
MrTollexp-R	AATGCACCAATTGCAACAAG	
β -actin-F	CCCAGAGCAAGAGAGGTA	337
β -actin-R	GCGTATCCTTCGTAGATGGG	
ตรวจหาเชื้อ <i>A. caviae</i>		
ACF	GGCGAGCCGCAGGCACCC	237
ACR	CTCGACGAAGGCCTTGATGCCC	
ผลิต dsRNA		
RNAiTollF	AACACAGTTTTTGGTCCCTGG	381
RNAiTollR	CAGCTTTTTTCGGTGGATGAG	

ตาราง 4 ลำดับดีเอ็นเอของ primer ที่ใช้ในการทดลองจากบริษัท 1st Base (ต่อ)

Primer	Primer sequence (5'-3')	ผลผลิต PCR (bp)
หาลำดับ cDNA <i>MrHC</i> HC-Fout HC-Rout	ACNTGGCAYATGGARTTYCC TANCCRTGGGCAATAGCATC	330
5'-RACE <i>MrHC</i> HC-5' RACE UPM	ACCACCATATCTGTCTTCCCACCAGAAG CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTG GTATCAACGCAGAGT	735
3'-RACE <i>MrHC</i> HC-3' RACE UPM	CCCCTTCTGGTGGGAAGACAGATATGG CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTG GTATCAACGCAGAGT	1,539
วิเคราะห์การแสดงออก HC-probe F HC- probe R	ACTTGGCATAACGGATTTCC GATATATCCACGGCCAATTGC	330
qPCR <i>MrHC</i> HC1-L HC1-R	TTGCTCTCATTCTGGCAGTC AGCTCCACATTGAGCATGAG	95
ผลิตโปรตีน <i>MrHC-C</i> HC1F HC1R	CGCGGATCCCCTCCATACACTCATGAAGA CCCAAGCTTATGG TATACTTTTACATAAGT	744

วิธีดำเนินการทดลอง

ดำเนินการโดยภาพรวม



1. การสกัดอาร์เอ็นเอจาก gill และ hepatopancreas ของกุ้งก้ามกรามและการสังเคราะห์ cDNA

นำกุ้งก้ามกรามที่ซื้อจากตลาดน้ำหน้าตัว 40 ถึง 45 กรัมต่อตัวมาสกัดอาร์เอ็นเอจาก gill และ hepatopancreas กุ้งโดยใช้วิธี TRIzol Reagent (Invitrogen) จากนั้นนำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ 2 ไมโครกรัม มาสังเคราะห์ cDNA โดยใช้เอนไซม์ SuperScript III First-Strand Synthesis (Invitrogen) และผสมสารต่างๆ ที่ใช้ในการสังเคราะห์ cDNA ดังตาราง 5

ตาราง 5 ส่วนผสมของการสังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอ gill และ hepatopancreas ของกุ้งก้ามกราม

ส่วนผสมของการสังเคราะห์ cDNA	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
RNA (0.4 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร)	5
Oligo(dT) ₁₅	1
10 mM dNTP	1
DEPC-treated water	6
ปริมาตรสุทธิ	13.0

นำหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตรที่ผสมสารต่างๆ เรียบร้อยแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นบ่มที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติมสารต่างๆ ดังตาราง 6

ตาราง 6 ส่วนผสมของการสังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอ gill และ hepatopancreas ของกุ้งก้ามกราม (ต่อ)

ส่วนผสมของการสังเคราะห์ cDNA	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
5X First-Strand buffer	4
0.1 M DTT	1
RNaseOUT™ (40 unit/ไมโครลิตร)	1
SuperScript III First-Strand Synthesis (Invitrogen) (400 unit/ไมโครลิตร)	1
ปริมาตรสุทธิ	20.0

นำหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตรที่ผสมสารต่างๆ เรียบร้อยแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นบ่มที่ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงบ่มที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นจึงทำลาย RNA โดยเติม *E. coli* RNaseH (2 unit/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที เก็บ cDNA ที่สังเคราะห์ได้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2. การโคลนและการหาลำดับ cDNA บางส่วนของยีน *MrToll* และยีน *MrHC*

2.1 การทำ PCR เพื่อหาลำดับดีเอ็นเอบางส่วนของยีน *MrToll* และยีน *MrHC*

ออกแบบ degenerate primer สำหรับหาลำดับดีเอ็นเอของยีน *MrToll* โดยการเปรียบเทียบบริเวณอนุรักษ์ (conserved regions) ส่วนของ TIR-domain ของโปรตีน Toll จากทั้งชนิดต่างๆ ดังนี้ *L. vannamei* (Protein ID: ABK58729), *F. chinensis* (Protein ID: ABQ59330), *M. japonicus* (Protein ID: BAG68890 และ BAF99007) และ *P. monodon* (Protein ID: ABO43764.1)

degenerate primers สำหรับหาลำดับดีเอ็นเอของยีน *MrToll* มีลำดับเบสดังนี้

TIR-F : 5'- TGYCTYCACTAYCGYGA CTG-3'

Toll-R1.5 : 5'- TGARAGCACSA CAATRG T-3'

(Y= C, T; R = A, G; S= C, G)

สำหรับการหาลำดับดีเอ็นเอของยีน *MrHC* ออกแบบ degenerate primer โดยการเปรียบเทียบบริเวณอนุรักษ์ของ hemocyanin จากทั้งชนิดต่างๆ ดังนี้ *Farfantepenaeus paulensis* (AAV48599.1), *P. monodon* (AAL27460.1), *M. japonicus* (ABR14693.1, AAS92971.1, ABR14694.1), *F. chinensis* (ACM61982.1), *Palaemonetes pugio* (AAX38504.1) และ *Metapenaeus ensis* (ABV58636.1)

degenerate primers สำหรับหาลำดับดีเอ็นเอของยีน *MrHC* มีลำดับเบสดังนี้

HC-Fout : 5'-ACNTGGCAYATGGARTTYCC-3'

HC-Rout : 5'-TANCCRTGGGCAATAGCATC-3'

(N= A, C, G, T; Y= C, T; R = A, G)

จากนั้นทำการหาลำดับดีเอ็นเอของยีน *MrToll* ด้วยวิธี PCR โดยใช้เอนไซม์ Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen) และผสมสารต่างๆ ที่ใช้ในการทำ PCR ดังตาราง 7

ตาราง 7 ส่วนผสมของการทำ PCR เพื่อหาลำดับดีเอ็นเอของยีน *MrToll*

ส่วนผสมของ PCR reaction	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
cDNA จาก gill ของกุ้งก้ามกราม	5
10X PCR buffer, Minus Mg	5
2.5 mM dNTP	4
50 mM MgCl ₂	1.5
Platinum [®] Taq DNA Polymerase (5 unit/ไมโครลิตร)	0.5
TIR-F primer (50 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1
Toll-R1.5 primer (50 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1
Nuclease-Free Water	32
ปริมาตรสุทธิ	50.0

นำหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตรที่ผสมสารต่างๆเรียบร้อยแล้ว ใส่ในเครื่อง thermal cycler กำหนดอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มจำนวน *MrToll* โดยใช้อุณหภูมิในขั้นตอน denaturation และ extension ตามคู่มือของ Invitrogen สำหรับเอนไซม์ Platinum[®] Taq DNA Polymerase ดังนี้

- ขั้นตอนที่ 1 initial denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
- ขั้นตอนที่ 2 denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
- ขั้นตอนที่ 3 annealing อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
- ขั้นตอนที่ 4 extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที
- ขั้นตอนที่ 5 ทำซ้ำขั้นตอนที่ (2)-(4) เป็นจำนวน 35 รอบ
- ขั้นตอนที่ 6 final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- ขั้นตอนที่ 7 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส คงที่ตลอด

สำหรับการหาลำดับดีเอ็นเอของยีน *MrHC* ทำเช่นเดียวกับการหาลำดับดีเอ็นเอของยีน *MrToll* โดยใช้ cDNA จาก hepatopancreas ของกุ้งก้ามกรามเป็นต้นแบบ เปลี่ยน primer เป็น HC-Fout และ HC-Rout และขั้นตอนที่ 4 extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้จากการทำ PCR มาวิเคราะห์ขนาดโดยใช้ 1% agarose gel ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วส่องดูผลภายใต้แสง UV สำหรับผลผลิต PCR ของ *MrToll* มีขนาด 96 bp และผลผลิต PCR ของ hemocyanin มีขนาด 330 bp จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการและสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ MinElute gel extraction (QIAGEN)

2.2 การโคลนลำดับดีเอ็นเอบางส่วนของยีน *MrToll* และยีน *MrHC* เข้าสู่ pCR 2.1 vector และการนำพลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* (transformation)

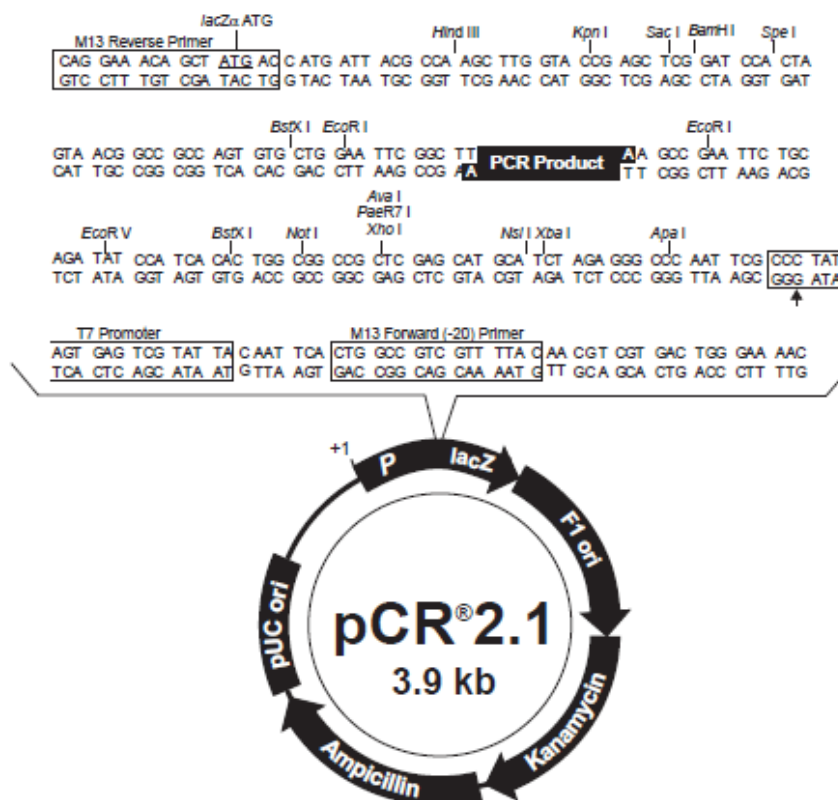
ทำการโคลนชิ้นส่วนของ *MrToll* และ *MrHC* เข้าสู่ pCR 2.1 vector (Invitrogen) (ภาพประกอบ 8) เนื่องจากผลผลิต PCR ของ *MrToll* และ *MrHC* ที่สังเคราะห์โดยใช้ *Taq*[®] Polymerase จะให้ผลผลิตที่มีปลาย deoxyadenosine (A) ยื่นออกทางปลาย 3' จึงต้องโคลนผลผลิต PCR นี้ เข้าสู่พลาสมิด TA Cloning vector ซึ่งเป็นพลาสมิดที่มี deoxythymidine (T) ยื่นออกทางปลาย 3' โดยทำการโคลนเข้าสู่พลาสมิด pCR 2.1 vector จาก TA Cloning® Kit ตามคู่มือของ Invitrogen โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase (Vivantis) ซึ่งใช้อัตราส่วนโดยโมลของพลาสมิด : ดีเอ็นเอ เป็น 1 : 5 (Sambrook; Fritsch; & Maniatis. 2000) ผสมสารต่าง ๆ ดังตาราง 8

ตาราง 8 ส่วนผสมของการทำ ligation ของผลผลิต PCR กับ pCR 2.1 vector

ส่วนผสมของการ ligation	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
pCR 2.1 vector (10 เฟมโตโมล/ไมโครลิตร)	1
ผลผลิตของ <i>MrToll</i> และ hemocyanin (25 เฟมโตโมล/ไมโครลิตร)	2
10X Ligation buffer	1
T4 DNA Ligase (200 unit/ไมโครลิตร)	0.5
Nuclease-Free Water	5.5
ปริมาตรสุทธิ	10.0

จากนั้นนำสารผสมไปปั่นที่ 16 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง เพื่อให้ดีเอ็นเอเชื่อมต่อกัน แล้วจึงนำมา transform เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ XL1-Blue เพื่อเพิ่มจำนวนพลาสมิด ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ ปิเปิดส่วนผสมของการทำ ligation จากตาราง 7 ใส่ในหลอดที่มี *E. coli* (200 ไมโครลิตร/หลอด) ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้ววางไว้บนน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นแช่ใน water bath ที่มีอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที (heat-shock) และแช่ในน้ำแข็งอีก 20 นาที จึงเติม LB agar ซึ่งอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส จำนวน 1000 ไมโครลิตร นำไปปั่นใน incubator shaker ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 225 รอบต่อนาที นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นแบ่ง XL1-Blue มา spread บน LB agar ที่มี ampicillin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, X-gal 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 25 ไมโครลิตร และ IPTG 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 12 ไมโครลิตร โดยปริมาตรเฟลตละ 100 ไมโครลิตร จำนวน 2 เฟลต แล้วนำไปปั่นข้ามคืนที่ 37 องศาเซลเซียส คัดเลือกโคโลนีโดยวิธี blue-white colonies มาตรวจสอบต่อไป (Sambrook; Fritsch; & Maniatis. 2000)

สำหรับวิธีเตรียม competent cell ทำตามวิธีของ Sambrook; Fritsch; & Maniatis (Sambrook; Fritsch; & Maniatis. 2000)



Comments for pCR[®]2.1 3929 nucleotides

LacZ α gene: bases 1-545
 M13 Reverse priming site: bases 205-221
 Multiple Cloning Site: bases 234-355
 T7 promoter: bases 362-381
 M13 (-20) Forward priming site: bases 389-404
 f1 origin: bases 546-983
 Kanamycin resistance ORF: bases 1317-2111
 Ampicillin resistance ORF: bases 2129-2989
 pUC origin: bases 3134-3807

ภาพประกอบ 8 โครงสร้างของ pCR 2.1 vector และตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ต่างๆ

2.3 การคัดเลือกโคลนของ *E. coli* ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCR 2.1-MrToll และ pCR

2.1-MrHC

การคัดเลือกโคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทำได้โดยนำโคลนที่คัดเลือกจากขั้นตอนที่ 2.2 มาเลี้ยงใน LB broth ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ที่เติม ampicillin (ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) โดยเลี้ยงไว้ข้ามคืนใน incubator shaker ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 225 รอบต่อนาที จากนั้นนำ culture ที่เลี้ยงไว้มาทำการสกัดพลาสมิดแล้วตัดด้วย *EcoRI*-HFTM restriction enzyme (New England Biolabs) ซึ่งควรจะได้ดีเอ็นเอ 2 ชิ้น โดยชิ้นหนึ่งมีขนาดประมาณ 3.9 กิโลเบส (kb) ของพลาสมิด (pCR 2.1 vector) และอีกชิ้นหนึ่งขนาดเท่ากับผลผลิต PCR ของ *MrToll* หรือของ *MrHC* โดยสามารถสังเกตได้เมื่อทำการแยกโดยใช้ 1% agarose gel ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วส่องดูผลภายใต้แสง UV

การสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุด QIAprep[®] Spin Miniprep kit ตามคู่มือของ QIAprep Miniprep Handbook มีขั้นตอนดังนี้ นำเชื้อที่เตรียมไว้มาปั่นใน microcentrifuge tube ที่ 18,000 x g นาน 2 นาที เก็บตะกอนเชื้อมา resuspend ในบัฟเฟอร์ P1 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 250 ไมโครลิตร และบัฟเฟอร์ N3 350 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ นำไปปั่นที่ 18,000 x g นาน 10 นาที ดูด supernatant ใส่ใน QIAprep[®] Spin column นำไปปั่นที่ 18,000 x g นาน 1 นาที ทิ้งสารละลายที่ผ่านออกมาและเติมบัฟเฟอร์ PB 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นที่ 18,000 x g นาน 1 นาที ทิ้งสารละลาย ล้างสารที่ปนเปื้อนทิ้งโดยเติมบัฟเฟอร์ PE 750 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นแยกสารละลายทิ้งที่ 18,000 x g นาน 1 นาที ปั่นแยกบัฟเฟอร์ PE ที่ตกค้างอยู่ทิ้งที่ 18,000 x g นาน 1 นาที แล้วเติมบัฟเฟอร์ EB 50 ไมโครลิตร เพื่อชะเอาพลาสมิดที่ต้องการออกจาก column โดยนำไปปั่นอีกครั้งที่ 18,000 x g นาน 1 นาที เก็บสารละลายที่ได้ที่ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำพลาสมิดที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ บั้มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง โดยทำการผสมสารต่างๆ ดังตาราง 9

ทำการวิเคราะห์ผลการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยแยกใน 1% agarose gel ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง ตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (Sambrook; Fritsch; & Maniatis. 2000)

ตาราง 9 ส่วนผสมของการตัดผลผลิต PCR ที่โคลนอยู่ใน pCR 2.1 vector ด้วย *EcoRI*-HF™

ส่วนผสมของการตัดผลผลิต PCR	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
พลาสมิด (pCR 2.1-MrToll หรือ pCR 2.1-MrHC)	5
<i>EcoRI</i> -HF™ restriction enzyme (20 unit/ไมโครลิตร)	0.5
10X buffer 4	1
10X BSA	1
Nuclease-Free Water	2.5
ปริมาตรสุทธิ	10

2.4 การหาลำดับดีเอ็นเอ

เมื่อหาโคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของ pCR 2.1-MrToll และ pCR 2.1-MrHC จากข้อ 2.3 ได้แล้ว พลาสมิดส่วนหนึ่งจะนำไปหาลำดับดีเอ็นเอของ MrToll และ MrHC โดยบริษัท 1st BASE (<http://base-asia.com>) และวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้โปรแกรม BioEdit (Hall; et al. 2011: 60-61) และ BlastX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของ ORF และการแปลรหัสเป็นโปรตีน สำหรับการหาลำดับดีเอ็นเอจะใช้ M13 Reverse primer และ M13 Forward primer ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้

M13 Reverse primer : 5'- CAGGAAACAGCTATGAC-3'

M13 Forward primer : 5'- GTAAAACGACGGCCAGT-3'

2.5 การโคลนและการหาลำดับ cDNA บางส่วนที่มีความยาวมากขึ้นของยีน *MrToll*

เนื่องจากลำดับดีเอ็นเอบางส่วนที่ได้จาก *MrToll* ขนาด 96 bp จึงจำเป็นต้องหาลำดับ cDNA ขนาดยาวขึ้นของยีน *MrToll* เพื่อให้ได้ข้อมูลมากขึ้น โดยนำลำดับดีเอ็นเอบางส่วนของ *MrToll* ที่ตรวจสอบความถูกต้องของ ORF และการแปลรหัสเป็นโปรตีน จากข้อ 2.4 แล้ว มาออกแบบ degenerate primer และ gene specific primer ต่อ *MrToll* เพื่อหาลำดับดีเอ็นเอขนาดยาวขึ้นต่อไป

degenerate primer และ gene specific primer สำหรับหาลำดับดีเอ็นเอของยีน *MrToll* มีลำดับเบสดังนี้

Toll-F6 : 5'-AAYCTRACMATTCCMWACAA-3'

Nested 5'-RACE : 5'-CTGATTTTGAATGTACTCTCCAGGTACC-3'

(W=A, T ; M= A, C)

ทำการหาลำดับดีเอ็นเอขนาดยาวของยีน *MrToll* ด้วยวิธี PCR โดยใช้เอนไซม์ Platinum[®] *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) ตามคู่มือของ Invitrogen และผสมสารต่างๆ ที่ใช้ในการทำ PCR เช่นเดียวกับตาราง 7 แต่ใช้ primer Toll-F6 และ Nested 5'-RACE จากนั้นนำผลผลิต PCR มาวิเคราะห์ขนาดโดยใช้ 1% agarose gel ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วส่องดูผลภายใต้แสง UV โดยผลผลิต PCR ของ *MrToll* มีขนาด 627 bp ตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ และสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุด MinElute gel extraction kit (QIAGEN) ทำการโคลนชิ้นส่วนของ *MrToll* เข้าสู่ pCR 2.1 vector และนำพลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ XL1-Blue โดยใช้อัตราส่วนในการ ligation และขั้นตอนการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ *E. coli* เหมือนข้อ 2.2 แล้วจึงคัดเลือกโคลนของ *E. coli* ที่มีรีคอมบิแนนท์ พลาสมิด pCR 2.1-MrToll เหมือนข้อ 2.3 นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของ pCR 2.1-MrToll ไปหาลำดับดีเอ็นเอเหมือนข้อ 2.4 เมื่อได้ผลลำดับดีเอ็นเอแล้ว นำข้อมูลลำดับดีเอ็นเอที่ได้ มาหาบริเวณที่ overlap กับลำดับดีเอ็นเอที่ได้ในข้อ 2.4 แล้วรวมข้อมูลลำดับดีเอ็นเอส่วนที่ overlap กันได้เป็นดีเอ็นเอขนาดยาวขึ้น

3. การหาข้อมูลลำดับ cDNA ทางปลาย 5' และปลาย 3' โดยวิธี Rapid amplification of 5' and 3' cDNA ends (RACE)

3.1 การสังเคราะห์ cDNA เส้นแรก (First-Strand cDNA Synthesis)

นำอาร์เอ็นเอจาก gill และ hepatopancreas ของกุ้งก้ามกรามที่สกัดได้จากข้อ 1 มาเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA เส้นแรกทางปลาย 5' (5' cDNA ends RACE) และปลาย 3' (3' cDNA ends RACE) โดยใช้ primer และขั้นตอนการสังเคราะห์ตามคู่มือของชุด SMARTer RACE cDNA Amplification kit (Clontech)

primer สำหรับสังเคราะห์ cDNA เส้นแรกทางปลาย 5' และปลาย 3' มีลำดับเบสดังนี้

5'-RACE CDS Primer A : 5'-(T)25V N-3'

3'-RACE CDS Primer A : 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)30 V N-3'

ทำการสังเคราะห์ cDNA เส้นแรกทางปลาย 5' โดยใช้ชุด SMARTer RACE cDNA Amplification kit (Clontech) และผสมสารต่างๆ ดังตาราง 10

ตาราง 10 ส่วนผสมของการสังเคราะห์ cDNA เส้นแรกทางปลาย 5'

ส่วนผสมของการสังเคราะห์ cDNA	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
RNA จาก gill หรือ hepatopancreas ของกุ้งก้ามกราม (30 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	2.75
12 μ M 5'-RACE CDS Primer A	1
ปริมาตรสุทธิ	3.75

นำหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตรที่ผสมสารดังตาราง 10 ใส่ในเครื่อง thermal cycler บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาทีและบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติมสารต่างๆ ลงในหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตรเดิม ดังตาราง 11

ตาราง 11 ส่วนผสมของการสังเคราะห์ cDNA เส้นแรกทางปลาย 5' (ต่อ)

ส่วนผสมของการสังเคราะห์ cDNA	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
5X First-Strand Buffer	2
20 mM DTT	1
10 mM dNTP	1
RNase inhibitor (40 unit/ไมโครลิตร)	0.25
SMARTScribe Reverse Transcriptase (100 unit/ไมโครลิตร)	1
SMARTer IIA oligo	1
ปริมาตรสุทธิ	10.0

นำหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตรที่ผสมสารต่างๆ เรียบร้อยแล้วใส่ในเครื่อง thermal cycler บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที และบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม Tricine-EDTA buffer 20 ไมโครลิตร (ในกรณีที่ RNA เริ่มต้นน้อยกว่า 200 นาโนกรัม) สำหรับการสังเคราะห์ cDNA เส้นแรกทางปลาย 3' ทำเช่นเดียวกับการสังเคราะห์ cDNA เส้นแรกทางปลาย 5' แต่เปลี่ยน primer จาก 5'-RACE CDS Primer A เป็น 3'-RACE CDS Primer A และส่วนผสมในตาราง 11 ไม่ต้องใส่ SMARTer IIA oligo นำสารละลายใส่ที่ได้เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

3.2 Rapid amplification of 5' and 3' cDNA ends (RACE)

เมื่อได้ข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของ *MrToll* และ *MrHC* ที่ตรวจสอบความถูกต้องของ ORF และการแปลรหัสเป็นโปรตีนจากข้อ 2.4 และ 2.5 แล้ว นำข้อมูลที่ได้มาออกแบบ gene specific primer (GSP) ต่อ *MrToll* และ *MrHC* เพื่อใช้ในการหาข้อมูลลำดับ cDNA ทางปลาย 5' และปลาย 3' ด้วยวิธี Rapid amplification of 5' and 3' cDNA ends (RACE) โดยใช้ชุด SMARTer RACE cDNA Amplification kit (Clontech)

3.2.1 การทำปฏิกิริยา 5'-RACE และ 3'-RACE ของ *MrToll*

primer สำหรับปฏิกิริยา 5'-RACE PCR ของ *MrToll* ประกอบด้วย GSP สำหรับ 5'-RACE และ 10X Universal Primer A Mix (UPM) มีลำดับเบสดังนี้

Nested2Toll 5'-RACE : 5'-ACAGTCACAGTCCCATGGATTTCAC-3'

10X Universal Primer A Mix (UPM) :

5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'

primer สำหรับปฏิกิริยา nested 5'-RACE PCR ของ *MrToll* ประกอบด้วย GSP สำหรับ nested 5'-RACE และ Nested Universal Primer A (NUP) มีลำดับเบสดังนี้

NToll-600R : 5'-CCTCTGACATCTAGAACC-3'

NUP : 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'

primer สำหรับปฏิกิริยา 3'-RACE PCR ของ *MrToll* ประกอบด้วย GSP สำหรับ 3'-RACE และ UPM มีลำดับเบสดังนี้

N2Toll 3'-RACE : 5'-CACAGTTTTGGTCCCTGGGCTTGAA-3'

UPM : 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'

ทำปฏิกิริยา 5'-RACE ของยีน *MrToll* โดยใช้เอนไซม์ 50x Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech) และใช้ cDNA เส้นแรกทางปลาย 5' ที่สังเคราะห์ได้จาก gill ในข้อ 3.1 เป็น cDNA ต้นแบบ ผสมสารต่างๆ ดังตาราง 12

ตาราง 12 ส่วนผสมของการทำปฏิกิริยา 5'-RACE PCR ของยีน *MrToll*

ส่วนผสมของการทำปฏิกิริยา 5'-RACE PCR	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
cDNA เส้นแรกทางปลาย 5' จาก gill ของกุ้งก้ามกราม	2.5
10X UPM	5
Nested2Toll 5'-RACE (10 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1
10mM dNTP	1
50x Advantage 2 Polymerase Mix (5 unit/ไมโครลิตร)	1
10x Advantage 2 PCR buffer	5
Nuclease-Free Water	34.5
ปริมาตรสุทธิ	50.0

นำหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตรที่ผสมสารต่างๆ เรียบร้อยแล้ว ใส่ในเครื่อง thermal cyclor กำหนดอุณหภูมิและเวลาสำหรับการทำปฏิกิริยาโดยวิธี touchdown PCR ตามคู่มือของ Clontech ดังนี้

- ขั้นตอนที่ 1 denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
- ขั้นตอนที่ 2 annealing และ denaturation
อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
- ขั้นตอนที่ 3 ทำซ้ำขั้นตอนที่ (1)-(2) เป็นจำนวน 5 รอบ
- ขั้นตอนที่ 4 denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
- ขั้นตอนที่ 5 annealing อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
- ขั้นตอนที่ 6 extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
- ขั้นตอนที่ 7 ทำซ้ำขั้นตอนที่ (4)-(6) เป็นจำนวน 5 รอบ
- ขั้นตอนที่ 8 denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
- ขั้นตอนที่ 9 annealing อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
- ขั้นตอนที่ 10 extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
- ขั้นตอนที่ 11 ทำซ้ำขั้นตอนที่ (8)-(10) เป็นจำนวน 30 รอบ
- ขั้นตอนที่ 12 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส คงที่ตลอด

จากนั้นวิเคราะห์ผลผลิต PCR ของ 5'-RACE โดยนำผลผลิตที่ได้มาแยกด้วย 1% agarose gel ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วส่องดูผล ภายใต้แสง UV สำหรับผลสังเคราะห์ 5'-RACE ของ *MrToll* มีขนาด 3,000 bp จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการและสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุด MinElute gel extraction kit (QIAGEN) ซึ่งผลผลิต PCR ของ 5'-RACE

ของ *MrToll* ที่ได้นี้สามารถนำมาเป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา nested 5'-RACE PCR ของ *MrToll* โดยใช้ผลผลิต PCR ของ 5'-RACE ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมใน Tricine-EDTA buffer 245 ไมโครลิตร (dilution 1:50) ตามคู่มือของ Clontech และนำมาใช้เป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา nested PCR ของ 5'-RACE โดยผสมสารต่างๆ ดังตาราง 13

ตาราง 13 ส่วนผสมของการทำปฏิกิริยา nested 5'-RACE PCR ยีน *MrToll*

ส่วนผสมของการทำปฏิกิริยา nested 5'-RACE PCR	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
5'-RACE dilution 1:50	2
10 μ M NUP	1
NToll-600R (10 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1
10mM dNTP	1
50x Advantage 2 Polymerase Mix (5 unit/ไมโครลิตร)	1
10x Advantage 2 PCR buffer	5
Nuclease-Free Water	39
ปริมาตรสุทธิ	50.0

นำหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตรที่ผสมสารต่างๆ เรียบร้อยแล้ว ใส่ในเครื่อง thermal cycler กำหนดอุณหภูมิและเวลาสำหรับการทำปฏิกิริยา nested 5'-RACE PCR ตามคู่มือของ Clontech ดังนี้

- ขั้นตอนที่ 1 denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
- ขั้นตอนที่ 2 annealing อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
- ขั้นตอนที่ 3 extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
- ขั้นตอนที่ 4 ทำซ้ำขั้นตอนที่ (1)-(3) เป็นจำนวน 35 รอบ
- ขั้นตอนที่ 5 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส คงที่ตลอด

จากนั้นวิเคราะห์ผลผลิต PCR จากการทำ nested 5'-RACE โดยนำผลผลิตที่ได้มาแยกด้วย 1% agarose gel ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วส่องดูผลภายใต้แสง UV สำหรับผลสังเคราะห์ nested 5'-RACE ของ *MrToll* มีขนาด 2,500 bp จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการและสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุด MinElute gel extraction kit (QIAGEN)

สำหรับการทำปฏิกิริยา 3'-RACE ของ *MrToll* ทำเช่นเดียวกับการทำปฏิกิริยา 5'-RACE โดยใช้ cDNA เส้นแรกทางปลาย 3' จาก gill ของกุ้งก้ามกรามเป็นต้นแบบและใช้ N2Toll 3'-RACE สำหรับ 3'-RACE ร่วมกับ 10XUPM ส่วนขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ใช้เวลา

2 นาที ซึ่งผลการสังเคราะห์ 3'-RACE ของ *MrToll* มีขนาด 1,500 bp จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการและสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุด MinElute gel extraction kit (QIAGEN)

3.2.2 การทำปฏิกิริยา 5'-RACE และ 3'-RACE ของ *MrHC*

primer สำหรับสังเคราะห์ 5'-RACE PCR ของ *MrHC* ประกอบด้วย GSP สำหรับ 5'-RACE และ UPM มีลำดับเบสดังนี้

HC-5' RACE : 5'-ACCACCATATCTGTCTTCCCACCAGAAG -3'

UPM : 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'

primer สำหรับสังเคราะห์ 3'-RACE PCR ของ *MrHC* ประกอบด้วย GSP สำหรับ 3'-RACE และ UPM มีลำดับเบสดังนี้

HC-3' RACE : 5'-CCCCTTCTGGTGGGAAGACAGATATGG -3'

UPM : 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'

ทำปฏิกิริยา 5'-RACE และ 3'-RACE ของยีน *MrHC* โดยใช้เอนไซม์ 50x Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech) และใช้ cDNA เส้นแรกทางปลาย 5' และปลาย 3' ที่สังเคราะห์ได้จาก hepatopancreas ในข้อ 3.1 เป็น cDNA ต้นแบบตามลำดับ สำหรับการทำปฏิกิริยา 5'-RACE และ 3'-RACE ของยีน *MrHC* ทำเช่นเดียวกับการทำปฏิกิริยา 5'-RACE และ 3'-RACE ของยีน *MrToll* โดย 5'-RACE ของยีน *MrHC* ใช้ HC-5' RACE และ UPM เป็น primer สำหรับการสังเคราะห์ 3'-RACE ของ *MrHC* ใช้ HC-3' RACE และ UPM เป็น primer โดยขั้นตอน extension ทำที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำผลการสังเคราะห์ 5'-RACE และ 3'-RACE มาวิเคราะห์ขนาดโดยใช้ 1% agarose gel ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วส่องดูผลภายใต้แสง UV ซึ่งผลการสังเคราะห์ 5'-RACE ของ *MrHC* มีขนาด 736 bp ขณะที่ 3'-RACE ของ *MrHC* มีขนาด 1,539 bp ตามลำดับ จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการและสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุด MinElute gel extraction kit (QIAGEN)

3.3 การโคลนและการหาลำดับดีเอ็นเอของ 5'-RACE และ 3'-RACE ของยีน *MrToll* และ *MrHC*

ทำการโคลนผลผลิต 5'-RACE และ 3'-RACE ขนาดต่างๆ ของ *MrToll* และ *MrHC* เข้าสู่ pCR 2.1 vector (Invitrogen) ซึ่งมีขั้นตอนเหมือนกับข้อ 2.2 โดยผสมส่วนผสมของการ ligation ดังตาราง 8 แต่จะใช้ 5'-RACE และ 3'-RACE ขนาดต่างๆ ของ *MrToll* (จากข้อ 3.2.1) และ *MrHC* (จากข้อ 3.2.2) แทนผลผลิตของ *MrToll* และ hemocyanin จากนั้นคัดเลือกโคลนของ *E. coli* ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCR 2.1- 5'-RACE และ pCR 2.1-3'-RACE ของยีน *MrToll* และ *MrHC* ซึ่งมีขั้นตอนเหมือนกับข้อ 2.4 นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดส่วนหนึ่งจะนำไปหาลำดับดีเอ็นเอและวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้โปรแกรม BioEdit และ BlastX เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของ

ORF และการแปลรหัสเป็นโปรตีน เหมือนข้อ 2.4 เมื่อได้ผลลำดับดีเอ็นเอแล้วนำข้อมูล 5'-RACE และ 3'-RACE ที่ได้มาหาบริเวณที่ overlap กันเพื่อรวมข้อมูลเป็นลำดับดีเอ็นเอของ MrToll และ MrHC ที่สมบูรณ์

4 การวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีน MrToll และ MrHC

นำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของ MrToll และ MrHC ที่สมบูรณ์จากการแปลรหัสยีนทั้งสอง แล้ว มาวิเคราะห์บริเวณต่างๆ ของโปรตีนโดยใช้โปรแกรม BLASTP (NCBI; [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) วิเคราะห์ signal peptide โดยใช้โปรแกรม SignalP program ([http:// www.cbs.dtu.dk/services/SignalP](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP)) วิเคราะห์บริเวณ extracellular domain, transmembrane domain, cytoplasmic domains และองค์ประกอบต่างๆ ของ MrToll และ MrHC โดยใช้โปรแกรม simple modular architecture research tool (SMART) (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) หาบริเวณ Potential N-linked glycosylation sites โดยใช้โปรแกรม NetNGlyc 1.0 Serve ([http://www.cbs.dtu.dk/services/ NetNGlyc/](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/)) และ บริเวณ Regulatory motifs ของ putative promoter region โดยใช้โปรแกรม NSITE program (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=nsite&group=programs&subgroup=promoter>)

5. การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยการสร้าง phylogenetic tree

นำข้อมูลลำดับโปรตีนของ MrToll และ MrHC ที่สมบูรณ์มาทำ Multiple sequence alignment โดยใช้โปรแกรม ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) เพื่อนำไปสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี neighbor joining โดยใช้ MEGA 5.0 software (Tamura; et al. 2011: 2731-2739) และ Bootstrap 1,000 ครั้ง โดยเปรียบเทียบความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการกับข้อมูลลำดับโปรตีนของ Toll receptor และ hemocyanin จากสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ

6. การศึกษาการแสดงออกของยีน MrToll และยีน MrHC ในอวัยวะต่าง ๆ ของกุ้ง ก้ามกรามโดยวิธี semi-quantitative reverse transcriptase PCR

6.1 การสกัดอาร์เอ็นเอจากอวัยวะต่าง ๆ ของกุ้ง

นำกุ้งก้ามกรามที่มีขนาดน้ำหนักตัว 40 ถึง 45 กรัมต่อตัวมาสกัดอาร์เอ็นเอจากอวัยวะต่างๆ ของกุ้ง ได้แก่ gill, hepatopancreas, hemocytes, stomach และ muscle โดยใช้ชุด Nucleospin RNA XS kit (Macherey-Nagel) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

นำอวัยวะต่างๆ ของกุ้งน้ำหนัก 1-5 มิลลิกรัมมาบดใน microcentrifuge tube จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ RA1 200 ไมโครลิตร และ TCEP 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดย vortex แล้วเติม Carrier RNA working solution 5 ไมโครลิตร (การเตรียม Carrier RNA working solution เตรียมโดยผสมบัฟเฟอร์ RA1 99 ไมโครลิตร กับ Carrier RNA stock solution 1 ไมโครลิตร) ลงใน

lysate ผสมให้เข้ากันโดย vortex นำไปปั่นที่ 1,000 x g นาน 1 นาที ตูด supernatant ใส่ใน NucleoSpin® Filter นำไปปั่นที่ 11,000 x g นาน 30 วินาที เพื่อกรอง pellet นำ supernatant ใส่ใน microcentrifuge tube เติม 70% EtOH 200 ไมโครลิตร ผสมเบาๆโดยปิเปตขึ้นลง 5 ครั้ง ตูด supernatant ใส่ใน NucleoSpin® RNA XS Column นำไปปั่นที่ 11,000 x g นาน 30 วินาที ทั้งสารละลายที่ผ่านออกมา แล้วนำ NucleoSpin® RNA XS Column ใส่ใน Collection Tube อันใหม่ เติมบัฟเฟอร์ MDB 100 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ 11,000 x g นาน 30 วินาที ทั้งสารละลายที่ผ่านออกมา จากนั้นทำลายดีเอ็นเอโดยเติม rDNase reaction mixture 25 ไมโครลิตร (rDNase 3 ไมโครลิตร ผสมกับบัฟเฟอร์ rDNase 27 ไมโครลิตร) ใส่ลงตรงกลาง silica membrane ของ column บ่มที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ RA2 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที นำไปปั่นที่ 11,000 x g นาน 30 วินาที ทั้งสารละลายที่ผ่านออกมาและ นำ NucleoSpin® RNA XS Column ใส่ใน Collection Tube อันใหม่ ล้างสารที่ปนเปื้อนทิ้งโดยเติมบัฟเฟอร์ RA3 400 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ 11,000 x g นาน 30 วินาที ทั้งสารละลายที่ผ่านออกมาและเติมบัฟเฟอร์ RA3 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ 11,000 x g นาน 2 นาที เพื่อแยกบัฟเฟอร์ที่ตกค้างอยู่ นำ NucleoSpin® RNA XS Column ใส่ใน microcentrifuge tube แล้วเติมน้ำ (RNase-free; supplied) 10 ไมโครลิตร เพื่อชะเอาอาร์เอ็นเอที่ต้องการออกจาก column โดยนำไปปั่นอีกครั้งที่ 11,000 x g นาน 30 วินาที เก็บสารละลายที่ได้ที่ -20 องศาเซลเซียส อาร์เอ็นเอที่ได้สามารถนำไปเป็นต้นแบบในการทำ RT-PCR ต่อไป

6.2 การทำ semi-quantitative reverse transcriptase PCR

ออกแบบ primer สำหรับใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *MrToll* และ *MrHC* ในอวัยวะต่างๆ โดยยีนที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมภายใน (internal control) คือ *β-actin* จัดเป็น house keeping gene ที่มีการแสดงออกทุกๆ เซลล์ของสิ่งมีชีวิต primer สำหรับศึกษาการแสดงออกของยีน *MrToll* มีลำดับเบสดังนี้

MrTollexp-F : 5'-AGTGGAAATCCATGGGACTG-3'

MrTollexp-R : 5'-AATGCACCAATTGCAACAAG-3'

primer สำหรับศึกษาการแสดงออกของยีน *MrHC* มีลำดับเบสดังนี้

HC-probe F : 5'-ACTTGGCATACGGATTTC -3'

HC- probe R : 5'-GATATATCCACGGCCAATTGC -3'

primer สำหรับศึกษาการแสดงออกของยีน *β-actin* มีลำดับเบสดังนี้ (Lu; et al. 2006: 274-284)

β-actin-F : 5'-CCCAGAGCAAGAGAGGTA-3'

β-actin-R : 5'-GCGTATCCTTCGTAGATGGG-3'

จากนั้นนำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ 5 นาโนกรัม เป็นอาร์เอ็นเอต้นแบบในการทำ Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) โดยใช้เอนไซม์ SuperScript III One-Step RT-PCR System (Invitrogen) และผสมสารต่างๆ ที่ใช้ในการทำ RT-PCR ดังตาราง 14

ตาราง 14 ส่วนผสมของการทำ RT-PCR จากอาร์เอ็นเอไวรัสต่างๆ ของกิ้งก่ามรกต

ส่วนผสมของการทำ RT-PCR	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
RNA อวัยวะต่างๆ ของกิ้งก่ามรกต (1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	5
MrTollexp-F (50 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1
MrTollexp-R (50 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1
2X Reaction Mix	25
SuperScriptR III RT/ Platinum Taq Mix	1
5 mM magnesium sulfate	4
DEPC-treated water	13
ปริมาตรสุทธิ	50.0

นำหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตรที่ผสมสารต่างๆ เรียบร้อยแล้ว ใส่ในเครื่อง thermal cycler กำหนดอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มจำนวน *MrToll* โดยใช้อุณหภูมิในขั้นตอน denaturation และ extension ตามคู่มือของ Invitrogen สำหรับเอนไซม์ SuperScript III One-Step RT-PCR System ดังนี้

ขั้นตอน cDNA synthesis

ขั้นตอนที่ 1 cDNA synthesis	อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
ขั้นตอนที่ 2	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

ขั้นตอน PCR amplification

ขั้นตอนที่ 3 denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที
ขั้นตอนที่ 4 annealing	อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
ขั้นตอนที่ 5 extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที
ขั้นตอนที่ 6 ทำซ้ำขั้นตอนที่ (3)-(5) เป็นจำนวน 35 รอบ	
ขั้นตอนที่ 7 final extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
ขั้นตอนที่ 8 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส คงที่ตลอด	

สำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีน *MrHC* ทำเช่นเดียวกับการศึกษาการแสดงออกของยีน *MrToll* โดยใช้ RNA อวัยวะต่างๆ ของกิ้งก่ามรกตเป็นต้นแบบ แต่เปลี่ยน primer เป็น HC-probeF และ HC-probeR และในขั้นตอนที่ 4 annealing ใช้อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และขั้นตอนที่ 5 extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำผลผลิต RT-PCR ที่ได้มาวิเคราะห์ขนาดโดยใช้ 1% agarose gel ที่ความต่างศักย์ 80

โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วส่องดูผลภายใต้แสง UV สำหรับผลผลิต RT-PCR ของ MrToll มีขนาด 200 bp และผลผลิต RT-PCR ของ MrHC มีขนาด 330 bp

นอกจากนี้การศึกษาการแสดงออกของยีน *MrToll* และ *MrHC* จำเป็นต้องมีการทำ RT-PCR ของยีน β -actin เพื่อใช้เป็น internal control โดยใช้ส่วนผสมของการทำ RT-PCR เหมือนกับ ตาราง 14 แต่เปลี่ยน primer เป็น β -actin-F และ β -actin-R และไม่ต้องเติม 5 mM magnesium sulfate สำหรับผลผลิต RT-PCR ของ β -actin มีขนาด 337 bp จากนั้นนำผลผลิต RT-PCR ที่ได้มา วิเคราะห์ขนาดและความเข้มของแถบดีเอ็นเอโดยใช้ 1% agarose gel ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วส่องดูผลภายใต้แสง UV โดยเปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอของยีน *MrToll* และ *MrHC* เทียบกับความเข้มของแถบดีเอ็นเอของยีน β -actin

7. การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย, กุ้งก้ามกราม และการทดลอง immune challenge สำหรับยีน *MrToll*

7.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อ *A. caviae* (AHHRI 06103) มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar (TSA; Difco, Sparks, MD, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำ โคโลนีเดี่ยวบน TSA มาเลี้ยงใน alkaline peptone water (APW) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงไว้ ขำมคินใน incubator shaker ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 225 รอบต่อนาที จากนั้นนำ culture ที่ เลี้ยงไว้มาปั่นแยกที่ 18,000 x g นาน 1 นาที เก็บตะกอนเชื้อมา resuspend ใน 2XPBS (Phosphate buffered saline: 135 mM NaCl, 15 mM sodium phosphate, and pH 7.2) และ นำไปวัด OD₆₀₀ เท่ากับ 1 (OD₆₀₀ = 1 เทียบได้กับเชื้อ *A. caviae* 1×10⁹ CFU/มิลลิลิตร ที่นับ โดยวิธี plate counting) จากนั้นเจือจางเชื้อให้มีความเข้มข้น 10³ CFU/ไมโครลิตร ด้วย 2XPBS เพื่อใช้ในการทดลอง bacterial challenge experiment

7.2 การเตรียมกุ้งก้ามกรามและการทดลอง immune challenge

นำกุ้งก้ามกรามน้ำหนักตัว 40 ถึง 45 กรัมต่อตัว มาเลี้ยงในถังพลาสติกขนาด 54 x 75 x 45 เซนติเมตร ความหนาแน่น 10 ตัวต่อถัง ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 วันเพื่อปรับสภาพ โดยให้อาหาร วันละครึ่ง จากนั้นแบ่งกุ้งออกเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม สำหรับกลุ่มทดลอง ทำ การฉีดเชื้อ *A. caviae* ความเข้มข้น 10³ CFU/น้ำหนักตัว(กรัม)ของกุ้ง โดยฉีดตัวละ 50 ไมโครลิตร ขณะที่กลุ่มควบคุมฉีด 2XPBS ที่ปราศจากเชื้อตัวละ 50 ไมโครลิตร ทำการเก็บตัวอย่างเม็ดเลือดกุ้ง กลุ่มละ 3 ตัวที่เวลาต่างๆ หลังจากฉีดเชื้อ ดังนี้ 0, 3, 6, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง นำมาสกัดอาร์ เอ็นเอโดยใช้ชุด Nucleospin RNA XS kit (Macherey-Nagel) เหมือนข้อ 6.1 และศึกษาการ แสดงออกของยีน *MrToll* ในเม็ดเลือดหลังจากฉีดเชื้อ *A. caviae* โดยวิธี semi-quantitative reverse transcriptase PCR เหมือนข้อ 6.2 จากนั้นเปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอของยีน *MrToll* ที่ เวลาต่างๆ ในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม และความเข้มของแถบดีเอ็นเอของยีน β -actin โดย

วิเคราะห์ข้อมูลเชิงปริมาณและนอร์มัลไลเซชัน (normalization) ข้อมูลด้วยโปรแกรม ImageJ software (<http://www.rsweb.nih.gov/ij/>) โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำและทดสอบความแตกต่างของค่า mean จากข้อมูลสองกลุ่ม (Student's *t*-test) ด้วยโปรแกรม SPSS ที่ค่า $p = 0.05$

เพื่อแสดงให้เห็นว่ากึ่งกลุ่มทดลองติดเชื้อ *A. caviae* จึงทำการตรวจการติดเชื้อแบคทีเรียในกึ่งก้ามกรามโดยเก็บตัวอย่างน้ำเลือดกึ่ง (hemolymph) กลุ่มละ 3 ตัวที่เวลาต่างๆ หลังจากฉีดเชื้อ ดังนี้ 0, 3, 6, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง โดยเก็บน้ำเลือดกึ่งจาก ventral sinuses ตัวละ 50 ไมโครลิตร นำมาเจือจางใน 2XPBS ในอัตราส่วน 1:100, 1:1,000 และ 1:10,000 จากนั้นนำตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 100 ไมโครลิตรในแต่ละ dilution มา spread ลงบน TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นในช่วงระหว่าง 30 ถึง 300 โคโลนี จากนั้นนำไปคำนวณหาจำนวนแบคทีเรียในหน่วย CFU/มิลลิลิตร

นอกจากนี้มีการทดสอบว่าโคโลนีที่เกิดขึ้นเป็นเชื้อ *A. caviae* ด้วยการทำ Colony PCR โดยใช้เทคนิค allele specific primer extension ตามวิธีของ Payattikul (Payattikul; et al. 2015: 164-171) จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลเชิงปริมาณและนอร์มัลไลเซชัน (normalization) โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำและทดสอบความแตกต่างของค่า mean จากข้อมูลสองกลุ่ม (Student's *t*-test) ด้วยโปรแกรม SPSS ที่ค่า $p < 0.05$

8. การผลิตอาร์เอ็นเอสายคู่

ทำการผลิตอาร์เอ็นเอสายคู่ด้วยวิธี *In vitro* transcription ในหลอดทดลอง โดยเลียนแบบการสร้างอาร์เอ็นเอจากสิ่งมีชีวิต ในปฏิกิริยาประกอบด้วยสายดีเอ็นเอต้นแบบ, โรโบนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ตัว ได้แก่ rGTP, rUTP, rATP, rCTP สารละลายบัฟเฟอร์ (transcription buffer) และเอนไซม์ T7 RNA polymerase

8.1 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดสำหรับ TIR domain ของยีน *MrToll*

ออกแบบ primer สำหรับใช้ในการผลิตอาร์เอ็นเอสายคู่ ด้วยโปรแกรม E-RNAi (Horn; & Boutros. 2010:332-339) โดยนำบริเวณ TIR domain ของยีน *MrToll* มาสร้างสายอาร์เอ็นเอซึ่งจะถูกโคลนเข้าพลาสมิด pGEM®-T Easy Vector ที่มี T7 และ Sp6 RNA polymerase promoter โดยโคลน TIR domain เข้าสู่พลาสมิดสองทิศทางคือ สาย sense (plus-strand) และ antisense (minus-strand) เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบที่นำมาทำปฏิกิริยา *In vitro* transcription

primer สำหรับสร้างดีเอ็นเอต้นแบบบริเวณ TIR domain ของยีน *MrToll* มีลำดับเบสดังนี้

RNAiTollIF : 5'-AACACAGTTTTGGTCCCTGG-3'

RNAiTollIR : 5'-CAGCTTTTTCGGTGGATGAG-3'

ทำการสร้างดีเอ็นเอต้นแบบบริเวณ TIR domain ของยีน *MrToll* ด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้เอนไซม์ SuperScript III One-Step RT-PCR System (Invitrogen) และผสมสารต่างๆ ที่ใช้ในการทำ RT-PCR เหมือนข้อ 6.2 ตาราง 14 โดยใช้อาร์เอ็นเอจากเม็ดเลือดของกิ้งก่ามรกตเป็นต้นแบบและใช้ RNAiTollF และ RNAiTollR เป็น primer ในปฏิกิริยา จากนั้นนำหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตรที่ผสมสารต่างๆ เรียบร้อยแล้ว ใส่ในเครื่อง thermal cycler กำหนดอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มจำนวน TIR domain ของยีน *MrToll* โดยใช้อุณหภูมิในขั้นตอน denaturation และ extension ตามคู่มือของ Invitrogen สำหรับเอนไซม์ SuperScript III One-Step RT-PCR System เหมือนกับขั้นตอนที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *MrToll* ข้อ 6.2 นำผลผลิต RT-PCR ที่ได้มาวิเคราะห์ขนาดโดยใช้ 1% agarose gel ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วส่องดูผลภายใต้แสง UV ผลผลิต RT-PCR บริเวณ TIR domain มีขนาด 381 bp ทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุด MinElute gel extraction kit (QIAGEN) ซึ่งมีขั้นตอนเหมือนข้อ 2.1 จากนั้นโคลนชิ้นส่วนของ TIR domain เข้าสู่ pGEM-T Easy Vector (Promega) (ภาพประกอบ 9) โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase ซึ่งใช้อัตราส่วนโดยโมลของพลาสมิด : ดีเอ็นเอ เป็น 1 : 5 (Sambrook; Fritsch; & Maniatis. 2000) ผสมสารต่างๆ ดังตาราง 15

ตาราง 15 ส่วนผสมของการทำ ligation ของผลผลิต PCR กับ pGEM-T Easy Vector

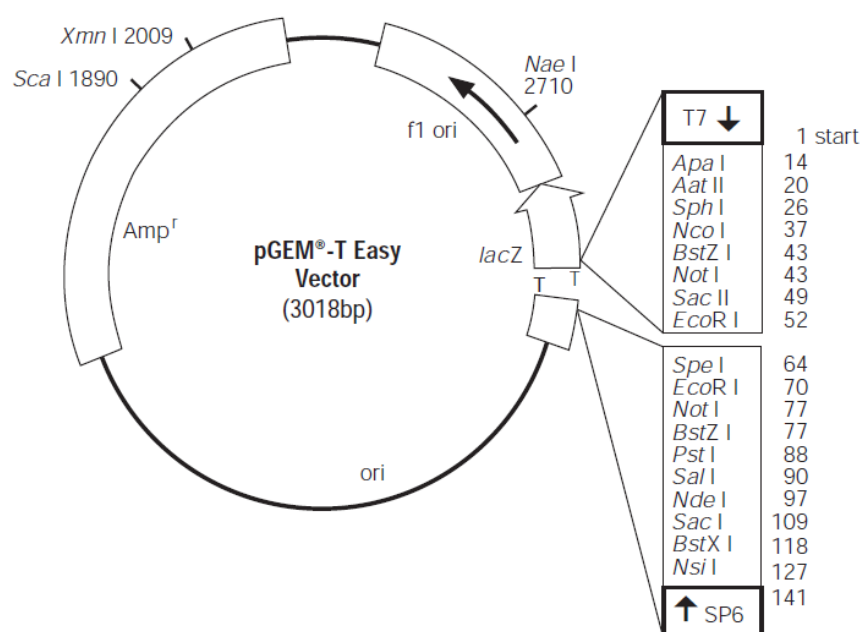
ส่วนผสมของการ ligation	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
pGEM-T Easy Vector (10 เฟมโตโมล/ไมโครลิตร)	1
ผลผลิตของ TIR domain ของยีน <i>MrToll</i> (25 เฟมโตโมล/ไมโครลิตร)	2
10X Ligation buffer	1
T4 DNA Ligase (200 unit/ไมโครลิตร)	0.5
Nuclease-Free Water	5.5
ปริมาตรสุทธิ	10.0

เมื่อผสมแล้วนำไปบ่มที่ 16 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เพื่อให้ดีเอ็นเอเชื่อมต่อกัน หลังจากนั้นจึงนำมา transform เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ XL1-Blue เหมือนข้อ 2.2 ทำการคัดเลือกโคลนของ *E. coli* ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy - TIR domain เหมือนข้อ 2.3 แต่จะตัดด้วย *Pst*I restriction enzyme บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง โดยทำการผสมสารต่างๆ ดังตาราง 16 เพื่อคัดเลือกพลาสมิดสาย sense และ antisense ซึ่งรีคอมบิแนนท์พลาสมิดสาย sense เมื่อถูกตัดด้วย *Pst*I จะได้ดีเอ็นเอ 2 ขนาดคือ ขนาดประมาณ 3,018 bp และขนาด 119 bp ขณะที่รีคอมบิแนนท์พลาสมิดสาย antisense มีขนาดประมาณ 3,018 bp และขนาด 312 bp

ตาราง 16 ส่วนผสมของการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy - TIR domain ด้วย *Pst*I

ส่วนผสมของการตัดผลผลิต PCR	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
พลาสมิด (pGEM-T Easy - TIR domain)	5
<i>Pst</i> I restriction enzyme (20 unit/ไมโครลิตร)	0.5
10X buffer 3	1
10X BSA	1
Nuclease-Free Water	2.5
ปริมาตรสุทธิ	10

จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดสาย sense และ antisense ส่วนหนึ่งจะนำไปหาลำดับดีเอ็นเอและวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้โปรแกรม BioEdit และ BlastX เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของ ORF และการแปลรหัสเป็นโปรตีนเหมือนข้อ 2.4



ภาพประกอบ 9 โครงสร้างของ pGEM-T Easy vector และตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ต่างๆ

8.2 การเตรียมดีเอ็นเอเส้นตรง (linearized DNA) สาย sense หรือ antisense

เนื่องจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด TIR domain ของยีน *MrToll* มีเพียงสาย sense หรือสาย antisense จึงต้องทำปฏิกิริยา 2 ครั้ง โดยสร้างอาร์เอ็นเอสายเดียวที่เป็นสาย sense หรือสาย antisense ก่อน แล้วจึงนำอาร์เอ็นเอสาย sense และสาย antisense มาผสมกันให้คู่เบสของแต่ละสายจับกันได้เป็นอาร์เอ็นเอสายคู่ภายหลัง โดยเริ่มจากการสกัดพลาสมิดให้ได้ปริมาณมากโดยใช้ชุด Geneaid Plasmid Midi kit ตามคู่มือของ Geneaid ซึ่งจะได้พลาสมิดในปริมาณสูงถึง 250 ไมโครกรัม จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทั้งสาย sense และ antisense มาตัดด้วยเอนไซม์ *SacI* restriction enzyme ปมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 4-5 ชั่วโมง โดยทำการผสมสารต่างๆ ดังตาราง 17 เพื่อเปิดวงพลาสมิดให้เป็นดีเอ็นเอเส้นตรง (linearized DNA Template) ซึ่งประกอบด้วยส่วน RNA polymerase promoter ต่อกับ TIR domain ของยีน *MrToll* สำหรับใช้เป็นต้นแบบในปฏิกิริยา *In vitro* transcription

ตาราง 17 ส่วนผสมของการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดสาย sense และ antisense ด้วย SacI

ส่วนผสมของการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดสาย sense และ antisense	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
พลาสมิดสาย sense หรือ antisense (pGEM-T Easy - TIR domain 100 ไมโครกรัม)	100
SacI restriction enzyme (20 unit/ไมโครลิตร)	15
10X buffer 4	15
10X BSA	15
Nuclease-Free Water	5
ปริมาตรสุทธิ	150

นำ linearized DNA สาย sense หรือ antisense มาวิเคราะห์ขนาดโดยใช้ 1% agarose gel ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง ทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุด MinElute gel extraction kit (QIAGEN) ซึ่งมีขั้นตอนเหมือนข้อ 2.1 โดย linearized DNA สาย sense หรือ antisense ที่ได้สามารถใช้เป็นต้นแบบในปฏิกิริยา *In vitro* transcription ต่อไป

8.3 ปฏิกิริยา *In vitro* transcription และการทำอาร์เอ็นเอบริสุทธิ์

ทำการสร้างอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวสาย sense และ antisense ด้วยวิธี *In vitro* transcription โดยใช้เอนไซม์ T7 RNA polymerase (Promega) และผสมสารต่างๆ ตามลำดับ ดังตาราง 18

ตาราง 18 ส่วนผสมของ *In vitro* transcription สาย sense และ antisense

ส่วนผสมของ <i>In vitro</i> transcription	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Transcription Optimized 5X Buffer	50
100 mM DTT	25
25 mM rNTPs	25
linearized DNA สาย sense หรือ antisense (50 ไมโครกรัม)	100
T7 RNA polymerase (18 unit/ไมโครลิตร)	13.88
Nuclease-Free Water	36.12
ปริมาตรสุทธิ	250.0

เมื่อผสมสารต่างๆ เรียบร้อยแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง เพื่อสร้างอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว จากนั้นนำส่วนผสมของ *In vitro* transcription ทั้งสาย sense และ

antisense มาผสมรวมในหลอดเดียวกันเพื่อสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ โดยหลังจากผสมกันแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อ denaturation แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้คู่เบสของแต่ละสายจับกันได้เป็นอาร์เอ็นเอสายคู่ จากนั้นทำลายดีเอ็นเอต้นแบบโดยเติมเอนไซม์ DNase I (Fermentas) และสารต่างๆ ลงในหลอดทดลอง ดังตาราง 19 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ตาราง 19 ส่วนผสมของการย่อยสลาย linearized DNA สาย sense และ antisense

ส่วนผสมของการย่อยสลาย linearized DNA	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
หลอดทดลองที่มี linearized DNA สาย sense และ antisense รวมกัน (<i>In vitro</i> transcription 100 ไมโครกรัม)	500
10X reaction buffer with MgCl ₂	70
DNase I, RNase-free (1 unit/ไมโครลิตร)	100
Nuclease-Free Water	30
ปริมาตรสุทธิ	700.0

อาร์เอ็นเอสายคู่ไปให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนออกไปด้วยการเติมสารละลาย phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) 700 ไมโครลิตร (1 เท่าของปริมาตรเริ่มต้น) บั่นแยกที่ 12,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ตูดสารละลายส่วนบนใส่ใน microcentrifuge tube อันใหม่ แล้วจึงเติม 3M sodium acetate (pH 5.2) 70 ไมโครลิตร (0.1 เท่าของปริมาตรเริ่มต้น) จากนั้นจึงตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยการเติม 100% EtOH 1,400 ไมโครลิตร (2 เท่าของปริมาตรเริ่มต้น) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วจึงบั่นแยกตะกอนอาร์เอ็นเอที่ 12,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ล้างตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 70% EtOH 1 มิลลิลิตร นำไปบั่นที่ 12,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทั้งสารละลายส่วนบน รอดตะกอนอาร์เอ็นเอแห้ง แล้วเติมน้ำ (RNase-free; supplied) 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายอาร์เอ็นเอที่ต้องการเก็บสารละลายที่ได้ที่ -20 หรือ -70 องศาเซลเซียส

สำหรับพลาสมิดที่ใช้ในการสังเคราะห์ dsRNA เพื่อใช้ฉีดกึ่งในกลุ่มควบคุม คือ pDrive-IMNV ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.แสงจันทร์ เสนาปิ่น นักวิจัย หน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศ เทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง Center of Excellence for Shrimp Molecular Biology and Biotechnology (Centex Shrimp) โดยบริเวณที่โคลนเข้าสู่เวกเตอร์ออกแบบจากจีโนมของเชื้อไวรัส infectious myonecrosis virus (IMNV) นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 5,789 ถึง 6,070 (GenBank accession no.EF061744) และใช้อาร์เอ็นเอ จากกุ้งขาว *P. vannamei* ที่ติดเชื้อไวรัส IMNV เป็นอาร์เอ็นเอ

ต้นแบบ (Senapin; et al. 2007: 32-38) ขั้นตอนการผลิต dsRNA จาก pDrive-IMNV เหมือนกับขั้นตอนในข้อ 8.2 และ 8.3 โดย dsRNA ที่ได้มีขนาด 282 bp

8.4 การตรวจสอบความเป็นอาร์เอ็นเอสายคู่

เมื่อสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ (dsRNA) และทำให้บริสุทธิ์แล้ว จากนั้นทำการทดสอบความสามารถของอาร์เอ็นเอที่สร้างขึ้นในการจับกันเป็นสายคู่ เพื่อเพิ่มความมั่นใจก่อนนำไปใช้ในสัตว์ทดลอง โดยนำ dsRNA ที่สังเคราะห์ขึ้นส่วนหนึ่งมาทดสอบด้วยเอนไซม์ต่างๆ แล้ววิเคราะห์โดยใช้ 1% agarose gel ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง

8.4.1 การย่อยดีเอ็นเอ (DNA)

ถ้าปฏิกิริยา *In vitro* transcription สามารถสังเคราะห์ ssRNA และถ้า ssRNA สาย sense และ antisense สามารถจับกันเป็น dsRNA ได้ เมื่อนำมาย่อยด้วย เอนไซม์ DNase I (Fermentas) ssRNA หรือ dsRNA ที่สังเคราะห์ขึ้นจะไม่ถูกทำลาย สามารถทดสอบโดยการเติมสารต่างๆ ดังตาราง 20 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยเติม 0.5M EDTA 2 ไมโครลิตร บ่มต่อที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

ตาราง 20 ส่วนผสมของการย่อยสลายดีเอ็นเอ

ส่วนผสมของการย่อยสลายดีเอ็นเอ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
dsRNA ที่สังเคราะห์ขึ้น	5
10X reaction buffer with MgCl ₂	1
DNase I, RNase-free (1 unit/ไมโครลิตร)	0.5
Nuclease-Free Water	3.5
ปริมาตรสุทธิ	10.0

8.4.2 การย่อยอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (ssRNA)

เมื่อนำ dsRNA ที่สังเคราะห์ขึ้นมาย่อยด้วย เอนไซม์ RNaseA (Fermentas) ที่ความเข้มข้นของเกลือสูง (ซึ่ง RNaseA จะย่อยสลาย ssRNA) ถ้าสาย sense และ antisense สามารถจับกันเป็น dsRNA ได้ ก็จะไม่ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ RNaseA สามารถทดสอบโดยการเติมสารต่างๆ ดังตาราง 21 บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที

ตาราง 21 ส่วนผสมของการย่อยสลายอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว

ส่วนผสมของการย่อยสลายอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
dsRNA ที่สังเคราะห์ขึ้น	5
20X SSC	1
RNaseA (0.1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร)	0.5
Nuclease-Free Water	3.5
ปริมาตรสุทธิ	10.0

8.4.3 การย่อยอาร์เอ็นเอสายคู่ (dsRNA)

ถ้าหาก ssRNA สาย sense และ antisense สามารถจับกันเป็น dsRNA ที่สมบูรณ์ได้ dsRNA ที่สังเคราะห์ขึ้นนี้จะถูกทำลายด้วยเอนไซม์ ShortCut RNase III (New England Biolabs) (ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยสลาย dsRNA) สามารถทดสอบโดยการเติมสารต่างๆ ดังตาราง 22 แล้วนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยเติม 10X EDTA 1 ไมโครลิตร

ตาราง 22 ส่วนผสมของการย่อยสลายอาร์เอ็นเอสายคู่

ส่วนผสมของการย่อยสลายอาร์เอ็นเอสายคู่	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
dsRNA ที่สังเคราะห์ขึ้น	5
10X ShortCut Reaction Buffer	1
ShortCut RNase III (1.3 units/ไมโครลิตร)	0.5
10X MnCl ₂	1
Nuclease-Free Water	2.5
ปริมาตรสุทธิ	10.0

9. การยับยั้งการแสดงออกของยีน *MrToll* ในกุ้งก้ามกรามโดยวิธี dsRNA-mediated RNA interference

นำกุ้งก้ามกรามน้ำหนักตัว 1 ถึง 1.5 กรัมต่อตัว มาเลี้ยงในบ่อปูนความหนาแน่น 200 ตัวต่อบ่อ ที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วันเพื่อปรับสภาพกุ้ง โดยให้อาหารวันละ 2 ครั้ง จากนั้นแบ่งกุ้งออกเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 30 ตัว ดังนี้

1. กลุ่มทดลองที่ฉีด dsRNA-Toll โดยฉีด dsRNA-Toll ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัวกุ้ง (กรัม) โดยใช้ปริมาตรที่ฉีด 50 ไมโครลิตร
2. กลุ่มควบคุมที่ฉีด dsRNA-IMNV โดยฉีด dsRNA- IMNV ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัวกุ้ง (กรัม) โดยใช้ปริมาตรที่ฉีด 50 ไมโครลิตร
3. กลุ่มควบคุมที่ฉีด 2XPBS ที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อกุ้งแต่ละตัว

จากนั้นเก็บตัวอย่าง muscle กุ้งกลุ่มละ 3 ตัวทุกวันตั้งแต่วันเริ่มต้น (วันที่ 0) ถึงวันที่ 7 นำมาสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ชุด Nucleospin RNA XS kit (Macherey-Nagel) เหมือนข้อ 6.1 และศึกษาการแสดงออกของยีน *MrToll* ในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมหลังจากถูก Knock-down ด้วย dsRNA-Toll โดยวิธี semi-quantitative reverse transcriptase PCR เหมือนข้อ 6.2 และทำ RT-PCR ของยีน β -actin เพื่อใช้เป็น internal control จากนั้นนำผลผลิต RT-PCR ที่ได้มาวิเคราะห์โดยใช้ 1% agarose gel ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วส่องดูผลภายใต้แสง UV โดยดูการแสดงออกของยีน *MrToll* ในแต่ละกลุ่มทดลองในวันต่างๆ ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ผลการทดลองพบว่า ยีน *MrToll* ถูกยับยั้งการแสดงออกอย่างสมบูรณ์ในวันที่ 2 หลังจากฉีดด้วย dsRNA-Toll

10. การทดลองฉีดเชื้อแบคทีเรียและ PBS ในกุ้งที่ถูก knock-down ยีน *MrToll*

นำกุ้งก้ามกรามน้ำหนักตัว 1 ถึง 1.5 กรัมต่อตัว จำนวน 120 ตัว แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 40 ตัว ดังนี้

1. กลุ่มทดลองที่ฉีด dsRNA-Toll โดยฉีด dsRNA-Toll ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัวกุ้ง (กรัม) โดยใช้ปริมาตรที่ฉีด 50 ไมโครลิตร
2. กลุ่มควบคุมที่ฉีด dsRNA-IMNV โดยฉีด dsRNA- IMNV ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัวกุ้ง (กรัม) โดยใช้ปริมาตรที่ฉีด 50 ไมโครลิตร
3. กลุ่มควบคุมที่ฉีด 2XPBS ที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อกุ้งแต่ละตัว

หลังจากฉีด dsRNA-Toll, dsRNA-IMNV และ 2XPBS 2 วัน ซึ่งเป็นวันที่ยีน *MrToll* ถูกยับยั้งการแสดงออกอย่างสมบูรณ์ (จากผลการทดลองในข้อ 9) จึงเริ่มฉีดเชื้อ *A. caviae* ในแต่ละกลุ่มทดลอง โดยแบ่งกลุ่มทดลองที่ฉีด dsRNA-Toll, กลุ่มควบคุมที่ฉีด dsRNA-IMNV และกลุ่มควบคุมที่ฉีด 2XPBS ออกเป็น 2 กลุ่มย่อย (กลุ่มละ 20 ตัว) โดยกลุ่มย่อยแรกฉีดเชื้อ *A. caviae* ความเข้มข้น 10^6 CFU ต่อน้ำหนักตัวกุ้ง (กรัม) โดยใช้ปริมาตรที่ฉีด 50 ไมโครลิตร และกลุ่มย่อยที่

สองชนิด 2XPBS ที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อกึ่งแต่ละตัว จากนั้นนับอัตราการตายของ กุ้งที่เวลาต่างๆ รวมทั้งเก็บตัวอย่างเลือดและ muscle กึ่งกลุ่มละ 3 ตัวที่เวลาต่างๆ ดังนี้ 0 ชั่วโมง, 3 ชั่วโมง, 6 ชั่วโมง, 9 ชั่วโมง, 24 ชั่วโมง, 48 ชั่วโมง, 72 ชั่วโมง, 96 ชั่วโมง และ 120 ชั่วโมง โดย muscle กึ่งจะนำมาสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ชุด Nucleospin RNA XS kit (Macherey-Nagel) เหมือน ข้อ 6.1 และศึกษาการแสดงออกของยีน *MrToll* โดยวิธี semi-quantitative reverse transcriptase PCR เหมือนข้อ 6.2 เพื่อเป็นการยืนยันว่ายีน *MrToll* ถูกยับยั้งการแสดงออกอย่างสมบูรณ์จริง สำหรับเลือดกุ้งจะนำมานับจำนวนแบคทีเรีย *A. caviae* บนอาหาร TSA ด้วยวิธี plate count ซึ่งมี ขั้นตอนดังนี้

เก็บตัวอย่างเลือดกุ้งตัวละ 50 ไมโครลิตรมาเจือจางใน 2XPBS ในอัตราส่วน 1:100, 1:1,000 และ 1:10,000 จากนั้นนำตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 100 ไมโครลิตรในแต่ละ dilution มา spread ลงบน TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นในช่วง ระหว่าง 30 ถึง 300 โคโลนี จากนั้นนำไปคำนวณหาจำนวนแบคทีเรียในหน่วย CFU/มิลลิลิตร

11. การเตรียมเชื้อไวรัส *MrNV*, กุ้งก้ามกราม และการทดลอง immune challenge สำหรับยีน *MrHC*

11.1 การเตรียมเชื้อไวรัส *MrNV*

เตรียมเชื้อไวรัสโดยนำลูกกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ *MrNV* มาบดและทำเชื้อไวรัสให้บริสุทธิ์ โดยวิธีการของ Ravi (Ravi; et al. 2010:428-433) นำสารละลายใส่ที่ได้เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

11.2 การเตรียมกุ้งก้ามกรามและการทดลอง immune challenge

นำกุ้งก้ามกรามน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อตัว มาเลี้ยงในถังพลาสติกขนาด 35 x 35 x 35 เซนติเมตร ความหนาแน่น 30 ตัวต่อถัง ที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วันเพื่อปรับสภาพ โดยให้อาหารวัน ละครั้ง จากนั้นแบ่งกุ้งออกเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม สำหรับกลุ่มทดลองทำการฉีด เชื้อไวรัส *MrNV* ที่เตรียมจากข้อ 11.1 โดยฉีดตัวละ 50 ไมโครลิตร ขณะที่กลุ่มควบคุมฉีด 2XPBS ที่ปราศจากเชื้อตัวละ 50 ไมโครลิตร ทำการเก็บตัวอย่าง muscle กึ่งกลุ่มละ 3 ตัว หลังจากฉีดเชื้อ ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 7 นำมาสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ชุด Nucleospin RNA XS kit (Macherey-Nagel) เหมือนข้อ 6.1 ตรวจสอบการติดเชื้อโดยการทำ RT-PCR ตามวิธีการของ Wangman (Wangman; et al. 2012:121-131) จากนั้นศึกษาการแสดงออกของยีน *MrHC* ใน muscle หลังจาก ฉีดเชื้อ *MrNV* โดยวิธี quantitative real-time PCR ตามขั้นตอนข้อ 12 จากนั้นเปรียบเทียบปริมาณ ยีน *MrHC* ที่เวลาต่างๆ ในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม กับปริมาณยีน β -actin

12 การศึกษาการแสดงออกของยีน *MrHC* ใน muscle กุ้งก้ามกรามหลังจากฉีดเชื้อ *MrNV* โดยวิธี quantitative real-time PCR (qPCR)

การทำ qPCR เป็นการวิเคราะห์ผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นจริง โดยมีการเติมสี (dye) ลงในปฏิกิริยา สีนั้นจะเรืองแสงขึ้นเมื่อจับกับดีเอ็นเอสั้นๆ ดังนั้น primer ที่ดีควรให้ผลผลิต PCR ขนาดระหว่าง 90-200 bp และไม่ควรเกิด primer-dimer เมื่อมีการสังเคราะห์ผลผลิต PCR ที่สมบูรณ์ในแต่ละรอบ ความเข้มของสัญญาณเรืองแสงจะเพิ่มเป็นสัดส่วนกับจำนวนผลผลิต PCR โดยระดับของสัญญาณเรืองแสงจะเพิ่มขึ้นตามจำนวนรอบของการทำ PCR และเมื่อมีการสร้างกราฟมาตรฐานขึ้นก็จะสามารถวิเคราะห์ได้ว่าต้องใช้จำนวนรอบกี่รอบในการทำ PCR เพื่อให้สามารถตรวจสอบสัญญาณเรืองแสงได้ ค่านี้เรียกว่าค่า cycle threshold (C_T) ซึ่งจะสอดคล้องกับจำนวนดีเอ็นเอเริ่มต้น โดยถ้ามีจำนวนดีเอ็นเอเริ่มต้นสูงก็จะมีค่า C_T ต่ำ

เมื่อได้ข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของ *MrHC* ที่ตรวจสอบความถูกต้องของ ORF และการแปลรหัสเป็นโปรตีนจากข้อ 2.4 แล้ว นำข้อมูลที่ได้มาออกแบบ primer สำหรับใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *MrHC* โดยใช้โปรแกรม GeneScript (<http://genscript.com/ssl-bin/app/primer>) เพื่อให้ได้ primer ที่เหมาะสม และใช้ยีน β -actin เป็น internal control primer สำหรับใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *MrHC* มีลำดับเบสดังนี้

HC1-L 5'-TTGCTCTCATTCTGGCAGTC-3'

HC1-R 5'-AGCTCCACATTGAGCATGAG-3'

primer สำหรับใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน β -actin จะใช้ primer β -actin-F และ β -actin-R (Lu; et al. 2006: 274-284)

12.1 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเพื่อใช้สร้างกราฟมาตรฐาน

การสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับใช้ในการเปรียบเทียบค่า C_T ระหว่างดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ทราบปริมาณกับดีเอ็นเอในตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ เริ่มจากการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน *MrHC* และยีน β -actin เพื่อใช้ในการคำนวณหาจำนวน copy number และนำมาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยนำอาร์เอ็นเอจาก hepatopancreas ของกุ้งก้ามกรามเป็นอาร์เอ็นเอต้นแบบในการสร้างดีเอ็นเอด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้เอนไซม์ SuperScript III One-Step RT-PCR System (Invitrogen) และผสมสารต่างๆ เช่นเดียวกับการทำ RT-PCR จาก RNA อวัยวะต่างๆ ของกุ้งก้ามกรามในตารางที่ 14 แต่ใช้ HC1-L และ HC1-R เป็น primer โดยขั้นตอน annealing ทำที่อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และขั้นตอน extension ทำที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที สำหรับยีน β -actin ทำเช่นเดียวกับการทำ RT-PCR ของยีน *MrHC* แต่เปลี่ยน primer เป็น β -actin-F และ β -actin-R จากนั้นนำผลผลิตที่เกิดขึ้นมาวิเคราะห์ขนาดโดยใช้ 1% agarose gel ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วส่องดูผลภายใต้แสง UV ซึ่งผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นจากยีน *MrHC* และยีน β -actin มีขนาด 95 bp และ 337 bp ตามลำดับ จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการและสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุด MinElute gel extraction

kit (QIAGEN) จากนั้นโคลนชิ้นส่วนของ MrHC และ β -actin เข้าสู่ pGEM-T Easy Vector (Promega) (ภาพประกอบ 9) โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase ซึ่งใช้อัตราส่วนโดยโมลของ พลาสมิด : ดีเอ็นเอ เป็น 1 : 5 (Sambrook; Fritsch; & Maniatis. 2000) ผสมสารต่างๆ ดังตาราง 15 จากนั้นปั่นที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เพื่อให้ดีเอ็นเอเชื่อมต่อกัน หลังจากนั้นจึงนำมา transform เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ XL1-Blue เพื่อเพิ่มจำนวนพลาสมิด ซึ่งมีขั้นตอนเช่นเดียวกับข้อ 2.2 จากนั้นคัดเลือกโคลนของ *E. coli* ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเหมือนข้อ 2.3 เมื่อหาโคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดได้แล้วพลาสมิดส่วนหนึ่งจะนำไปหาลำดับดีเอ็นเอเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 2.4 เก็บรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน *MrHC* และยีน β -actin ที่ได้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้คำนวณหาจำนวน copy number และนำมาสร้างกราฟมาตรฐานในการทำ qPCR ต่อไป

12.2 การสังเคราะห์ cDNA

นำอาร์เอ็นเอของกึ่งกล้ามเนื้อสกัดได้จากข้อ 11.2 กลุ่มทดลองที่ฉีดเชื้อไวรัส *MrNV* และกลุ่มควบคุมที่ฉีด 2XPBS ที่ปราศจากเชื้อ มาสังเคราะห์ cDNA ส่วนของยีน *MrHC* โดยใช้เอนไซม์ GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega) และผสมสารต่างๆ ที่ใช้ในการสังเคราะห์ cDNA ดังตาราง 23

ตาราง 23 ส่วนผสมของการสังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอ muscle ของกึ่งกล้ามเนื้อ

ส่วนผสมของการสังเคราะห์ cDNA	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
RNA muscle ของกึ่งกล้ามเนื้อ (1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร)	1
HC1-L primer (20 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1
HC1-R primer (20 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1
Nuclease-Free Water	2
ปริมาตรสุทธิ	5.0

นำหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตรที่ผสมสารต่างๆ เรียบร้อยแล้วปั่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นปั่นในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารต่างๆ ดังตาราง

ตาราง 24 ส่วนผสมของการสังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอ muscle ของกิ้งก่ามกราคม (ต่อ)

ส่วนผสมของการสังเคราะห์ cDNA	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
GoScript™ 5X Reaction Buffer	4
Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor (40 unit/ไมโครลิตร)	0.5
GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega)	1
PCR Nucleotide Mix	1
25mM MgCl ₂	1.6
Nuclease-Free Water	6.9
ปริมาตรสุทธิ	15.0

นำหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตรที่ผสมสารต่างๆ เรียบร้อยแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นบ่มที่ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงบ่มที่ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เก็บ cDNA ที่สังเคราะห์ได้ที่ -20 องศาเซลเซียส

นอกจากนี้การศึกษาการแสดงออกของยีน *MrHC* จำเป็นต้องมีการสังเคราะห์ cDNA ของยีน *β-actin* เพื่อใช้เป็น internal control โดยใช้ส่วนผสมของการสังเคราะห์ cDNA เหมือนกับตาราง 22 และตาราง 23 แต่เปลี่ยน primer เป็น *β-actin-F* และ *β-actin-R*

12.3 การทำ quantitative real-time PCR analysis

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *MrHC* จะต้องนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จากข้อ 12.1 ที่ทราบจำนวน copy number แล้ว มาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยา qPCR เพื่อใช้สร้างกราฟมาตรฐานในการเปรียบเทียบกับ การแสดงออกของยีน *MrHC* ของกิ้งก่าปกติและกิ้งก่าที่ติดเชื้อ *MrNV* ที่ใช้ cDNA ที่ได้จากข้อ 12.2 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งในแต่ละปฏิกิริยาจะต้องทำพร้อมกันในเครื่อง 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

เริ่มจากนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีจำนวน copy number 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 และ 1 ตามลำดับ และ cDNA ที่สังเคราะห์ได้จากข้อ 12.2 เป็นต้นแบบในการทำ qPCR โดยใช้เอนไซม์ GoTaq® qPCR Master Mix (Pomega) และผสมสารต่างๆ ดังตาราง 25

ตาราง 25 ส่วนผสมของการทำ qPCR

ส่วนผสมของการทำ qPCR	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
รีคอมบิแนนท์พลาสมิด MrHC (10^4 , 10^3 , 10^2 , 10, 1 copy number)	10
HC1-L primer (15 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1
HC1-R primer (15 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1
2X GoTaq® qPCR Master Mix	25
Nuclease-Free Water	13
ปริมาตรสุทธิ	50.0

ส่วนผสมของการทำ qPCR ของ cDNA muscle กึ่งก้ำกักรวมทำเช่นเดียวกับตาราง 25 แต่เปลี่ยนดีเอ็นเอต้นแบบเป็น cDNA muscle กึ่งก้ำกักรวมที่สังเคราะห์ได้จากข้อ 12.2

นำหลอด reaction well ที่ผสมสารต่างๆ เรียบร้อยแล้วใส่ในเครื่อง 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) กำหนดอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มจำนวน *MrHC* โดยใช้อุณหภูมิในขั้นตอน denaturation, extension และ dissociation ตามคู่มือของ Promega สำหรับเอนไซม์ GoTaq® qPCR Master Mix ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 initial denaturation	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
ขั้นตอนที่ 2 denaturation	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที
ขั้นตอนที่ 3 annealing	อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที
ขั้นตอนที่ 4 extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 34 วินาที
ขั้นตอนที่ 5 ทำซ้ำขั้นตอนที่ (2)-(4) เป็นจำนวน 30 รอบ	
ขั้นตอนที่ 6 dissociation	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที อุณหภูมิ 97 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที
ขั้นตอนที่ 7	อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส คงที่ตลอด

สำหรับการทำ qPCR ของยีน *β -actin* ทำเช่นเดียวกับการทำ qPCR ของยีน *MrHC* แต่เปลี่ยน primer เป็น *β -actin-F* และ *β -actin-R* นอกจากนี้ทำ qPCR โดยใช้ Nuclease-Free Water เป็น negative control ด้วย จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้จากการทำ qPCR มาวิเคราะห์ขนาดโดยใช้ 1.5% agarose gel ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วส่องดูผลภายใต้แสง UV สำหรับผลผลิต PCR ของ *MrHC* มีขนาด 95 bp และผลผลิต PCR ของ *β -actin* มีขนาด 337 bp

วิเคราะห์ข้อมูลเชิงปริมาณจากการทำ qPCR ด้วยวิธี $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Kenneth; & Thomas. 2001: 402–408) โดยใช้ยีน β -actin ในการนอร์มัลไลเซชัน (normalization) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean $\pm$ standard deviation) มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (One-way anova) ของการแสดงออกของยีน *MrHC* ในกลุ่มกึ่งติดเชื้อและกึ่งปกติ เพื่อหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

13 การศึกษาคุณสมบัติการต้านจุลชีพของโปรตีน MrHC ด้านปลาย C (MrHC-C)

งานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานว่าการดอมีโนทางด้านปลาย C ของโปรตีน hemocyanin มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (hemocyanin-immunoglobulin-like domain) จึงออกแบบ primer สำหรับศึกษาคุณสมบัติการต้านจุลชีพของโปรตีน MrHC ทางด้านปลาย C (MrHC-C) พบว่าสามารถเพิ่มจำนวน MrHC-C และนำเข้าสู่ pQE-30 vector ได้

13.1 การทำ RT-PCR เพื่อเพิ่มจำนวน MrHC-C

ออกแบบ primer สำหรับเพิ่มจำนวน MrHC-C จากบริเวณควบคุมการสังเคราะห์ปลาย C ของยีน *MrHC* ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 1,231 ถึง 1,974 ซึ่งแต่ละ primer มีการเติมบริเวณที่ใช้ในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) เพื่อใช้สำหรับนำผลผลิต PCR เข้าสู่พลาสมิดที่เป็น expression vector โดย primer HC1F และ HC1R จะเติม *Bam*HI restriction site และ *Hind*III restriction site ที่ปลาย 5' ของ primer ตามลำดับ primer สำหรับเพิ่มจำนวน MrHC-C มีลำดับเบสดังนี้

HC1F: 5'-CGCGGATCCCCTCCATAC ACTCATGAAGA-3'

HC1R: 5'-CCCAAGCTTATGG TATACTTTCACATAAGT-3'

(บริเวณที่ขีดเส้นใต้คือบริเวณที่ใช้ในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III)

ทำการสังเคราะห์ส่วน MrHC-C โดยนำอาร์เอ็นเอจาก hepatopancreas เป็นอาร์เอ็นเอต้นแบบในการทำ RT-PCR โดยใช้เอนไซม์ SuperScript III One-Step RT-PCR System (Invitrogen) และผสมสารต่างๆ เช่นเดียวกับการทำ RT-PCR จากอาร์เอ็นเอไวรัสต่างๆ ของกิ้งก่ามกรามในตารางที่ 14 แต่ใช้ HC1F และ HC1R เป็น primer โดยขั้นตอน extension ทำที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จากนั้นนำผลการสังเคราะห์ส่วน MrHC-C มาวิเคราะห์ขนาดโดยใช้ 1% agarose gel ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วส่องดูผลภายใต้แสง UV ซึ่งผลการสังเคราะห์ส่วน MrHC-C มีขนาด 744 bp จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการและสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุด MinElute gel extraction kit (QIAGEN)

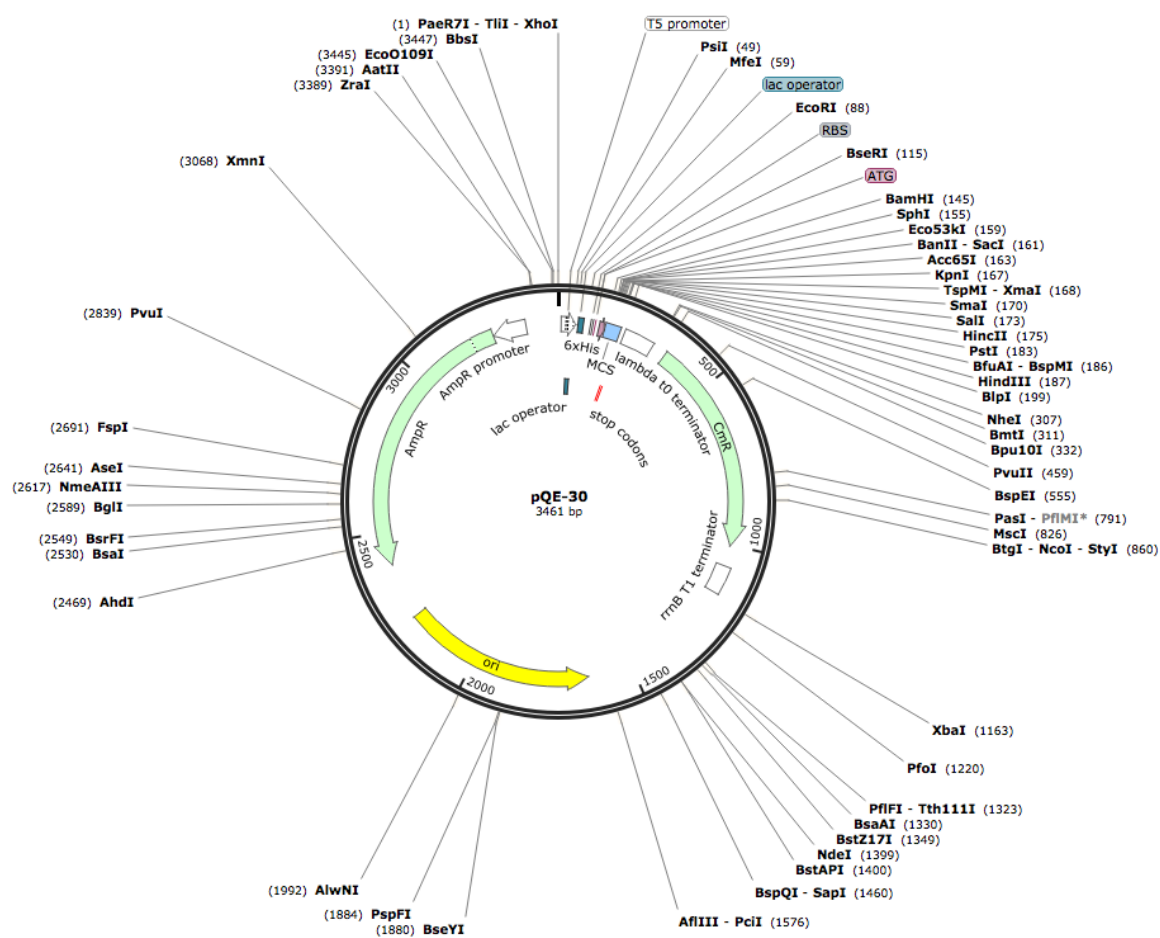
13.2 การโคลนส่วนของ MrHC-C เข้าสู่ pQE-30 vector และการนำพลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* (transformation)

ทำการโคลนชิ้นส่วนของ MrHC-C เข้าสู่ pQE-30 vector (Qiagen) (ภาพประกอบ 10) ซึ่ง pQE-30 vector จะตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III ก่อนจะนำไปแยกใน 1% agarose gel ตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการและสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ Minelute gel extraction kit (Qiagen)

โคลนผลผลิต PCR ส่วน MrHC-C ที่มีบริเวณตัดจำเพาะของ *Bam*HI และ *Hind*III เข้ากับ pQE-30 vector ซึ่งถูกตัดไว้ด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกัน โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase ซึ่งใช้อัตราส่วนโดยโมลของพลาสมิด : ดีเอ็นเอ เป็น 1 : 5 (Sambrook; Fritsch; & Maniatis. 2000) โดยใช้สารต่างๆ เช่นเดียวกับตาราง 8 แต่ใช้ pQE-30 vector และผลผลิต PCR ส่วน MrHC-C แทน จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เพื่อให้ดีเอ็นเอเชื่อมต่อกัน หลังจากนั้นจึงนำมา transform เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ M15 เพื่อเพิ่มจำนวนพลาสมิด ซึ่งมีขั้นตอนเช่นเดียวกับการนำพลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ XL1-Blue ในข้อ 2.2 จากนั้นเลือกโคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของ pQE-30-MrHC-C เช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 2.3 แต่ใช้เอนไซม์ *Bam*HI และ *Hind*III ในการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดและวิเคราะห์บน 1% agarose ซึ่งควรจะได้ดีเอ็นเอ 2 ชิ้น โดยชิ้นหนึ่งมีขนาดประมาณ 3.4 กิโลเบส (kb) ของ พลาสมิด (pQE-30 vector) และอีกชิ้นหนึ่งขนาดเท่ากับผลผลิต PCR ของส่วน MrHC-C เมื่อหาโคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดได้แล้วพลาสมิดส่วนหนึ่งจะนำไปหาลำดับดีเอ็นเอของ pQE-30-MrHC-C เช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 2.4

13.3 การกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนของส่วน MrHC-C

การกระตุ้นการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนเริ่มจากนำ *E. coli* สายพันธุ์ M15 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของ pQE-30-MrHC-C ที่ตรวจสอบความถูกต้องของ ORF จากข้อ 13.2 มาเลี้ยงใน LB broth 10 มิลลิลิตร (ที่มี ampicillin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผสมอยู่) บ่มข้ามคืนใน shaker ที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 225 รอบต่อนาที จากนั้นแบ่งเชื้อที่เตรียมไว้ 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลasks ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 225 รอบต่อนาที จนมี OD ที่ 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.5-0.7 แล้วเติม isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) ลงไปกระตุ้นโดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปเขย่าต่ออีก 4 ชั่วโมง นำเชื้อไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 x g ประมาณ 20 นาที จากนั้นนำเซลล์ที่เก็บได้เติมบัฟเฟอร์ B (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl, 8 M Urea pH 8) 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเติม phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำไปทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonicate) ที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บ lysate ที่ได้ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส (Sambrook; Fritsch; & Maniatis. 2000)



ภาพประกอบ 10 โครงสร้างของ pQE-30 vector และตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ต่างๆ

13.4 การตรวจสอบหารีคอมบิแนนท์โปรตีน

นำ lysate ที่ได้จากข้อ 13.3 มาผสมกับบัฟเฟอร์ 2X SDS-treatment ในอัตราส่วน 1 : 1 แล้วต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที จากนั้นนำมาแยกด้วย 10% SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยใช้ *E. coli* สายพันธุ์ M15 ที่มีเฉพาะพลาสมิด pQE-30 ซึ่งจะผลิตโปรตีนฮิสทีดีน 6 หน่วย (six-histidine-tagged) เป็น positive control เพื่อดูว่าการกระตุ้นด้วย IPTG ประสบความสำเร็จหรือไม่ และ *E. coli* สายพันธุ์ M15 ที่ไม่มีพลาสมิด เป็น negative control แยกโปรตีนโดยผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 80 โวลต์ ประมาณ 2 ชั่วโมง ย้อมเจลดด้วย Coomassie brilliant blue R-250 สังเกตแถบของรีคอมบิแนนท์โปรตีน pQE-30-MrHC-C เทียบกับโปรตีนจาก *E. coli* สายพันธุ์ M15 ที่มีและไม่มีพลาสมิด pQE-30 vector

13.5 การทำรีคอมบิแนนท์โปรตีน pQE-30-MrHC ให้บริสุทธิ์

การทดสอบคุณสมบัติของโปรตีน MrHC-C จำเป็นต้องทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ในรูปแบบ native เพื่อให้โปรตีนที่ผลิตได้มีคุณสมบัติเหมือนโปรตีนทางด้านปลาย C ที่ผลิตจากยีน *MrHC* ของกิ้งก่ามกราม โดยนำ *E. coli* สายพันธุ์ M15 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของ pQE-30-MrHC-C มากระตุ้นการแสดงออกเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 13.3 แต่ไม่ต้องเติมบัฟเฟอร์ B และ PMSF เนื่องจากบัฟเฟอร์ B มีส่วนผสมของยูเรีย ซึ่งจะทำให้โปรตีนที่ผลิตได้เสียสภาพ การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ในรูปแบบ native จะนำเซลล์ที่เก็บได้จากข้อ 13.3 มาทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด Ni-NTA Superflow columns kit ตามคู่มือของ Qiagen เก็บสารละลายโปรตีนที่ได้ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

13.6 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

การวิจัยครั้งนี้ใช้แบคทีเรียแกรมบวก 4 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11787, *B. megaterium* และ *B. subtilis* จากภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ แบคทีเรียแกรมลบ 9 ชนิด ได้แก่ *Vibrio vulnificus* DMST 27426, *V. harveyi* DMST 1526, *V. mimicus* DMST 27430, *V. parahaemolyticus* DMST 22093, *A. caviae* AHHRI 06103, *A. veronii* DMST 21255, *A. hydrophila* DMST 22095, *E. coli* ATCC 25922 และ *E. coli* สายพันธุ์ M15 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pQE30-MrHC-C นำเชื้อแบคทีเรียมาแกรมบวกมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) ส่วนเชื้อ *Vibrio*. sp. เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่มีความเข้มข้นของเกลือ 2% เชื้อ *Aeromonas*. sp. เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และเชื้อ *E. coli* เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้นคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว Mueller Hinton broth ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37°C ใน incubator shaker 225 รอบต่อนาที จากนั้นนำเชื้อที่เตรียมไว้มาปั่นที่ 3,000 x g นาน 20 นาที เก็บตะกอนเชื้อมาละลายใน PBS 4 มิลลิลิตร จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงจนมี OD ที่ 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.2-0.5

13.7 การทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

ทดสอบคุณสมบัติของโปรตีน MrHC-C ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี Agar well diffusion โดยนำ agarose 0.2 กรัม ผสมลงใน Poor borth 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปอุ่นด้วยไมโครเวฟจนหลอมเป็นเนื้อเดียวกัน รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลง จึงใส่เชื้อแบคทีเรียที่เตรียมจากข้อ 13.6 โดยคำนวณให้มีค่า OD สุดท้ายเท่ากับ 0.2 ผสมให้เข้ากัน เทลงในเพลต (1 เชื้อต่อ 1 เพลต) เจาะหลุมด้วย cork-borer (เส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร) จำนวน 6 หลุมต่อเพลต หยอดโปรตีน และยาปฏิชีวนะหลุมละ 80 ไมโครลิตร ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายดังต่อไปนี้ Kanamycin 100, ไมโครกรัม, Ampicillin 200 ไมโครกรัม, โปรตีน MrHC-C 25 ไมโครกรัม, PBS, บัฟเฟอร์ NPI 250 ที่มี 250 mM imidazole และ บัฟเฟอร์ NPI 250 ที่ไม่มี imidazole จากนั้นนำไปบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37°C นำมาวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของขอบเขตยับยั้ง (inhibition zone)



บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การแยกยีนและและศึกษาคุณสมบัติของ *MrToll*

1.1 การโคลนและการหาลำดับ cDNA บางส่วนของยีน *MrToll*

1.1.1 การออกแบบ degenerate primers

จากการออกแบบ degenerate primers สำหรับหาลำดับดีเอ็นเอของยีน *MrToll* โดยการเปรียบเทียบบริเวณ conserved region ส่วนของ TIR-domain ของโปรตีน Toll จากกุ้งชนิดต่างๆ ดังนี้ *L. vannamei* (Protein ID: ABK58729), *F. chinensis* (Protein ID: ABQ59330), *M. japonicus* (Protein ID: BAG68890 และ BAF99007) และ *P. monodon* (Protein ID: ABO43764.1) แสดงในภาพประกอบ 11

degenerate primer สำหรับหาลำดับดีเอ็นเอของยีน *MrToll* มีลำดับเบสดังนี้

TIR-F : 5'- TGYCTYCACTAYCGYGACTG-3'

Toll-R1.5 : 5'- TGARAGCACSAACAATRGT-3'

(Y= C, T; R = A, G; S= C, G)

1.1.2 การโคลนและการหาลำดับ cDNA บางส่วนของยีน *MrToll*

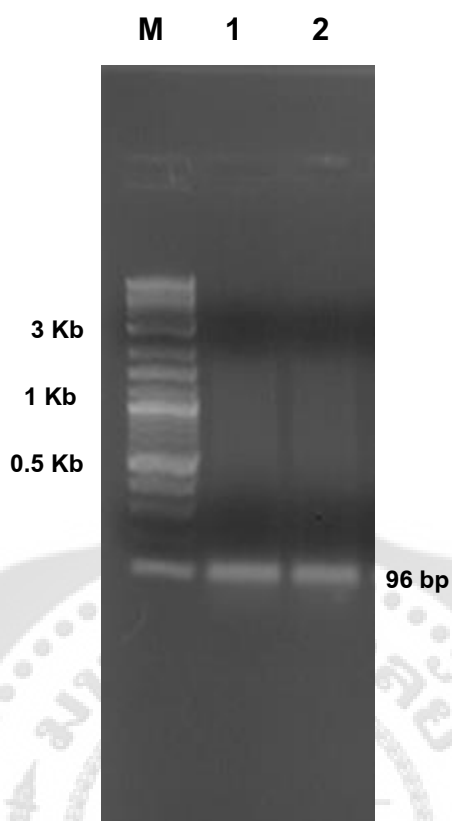
จากการนำอาร์เอ็นเอที่สกัดจาก gill ของกุ้งก้ามกรามมาสังเคราะห์ cDNA เพื่อใช้เป็นต้นแบบสำหรับหาลำดับดีเอ็นเอของยีน *MrToll* พบว่าผลผลิต PCR ของ *MrToll* มีความยาว 96 bp (ภาพประกอบ 12) จากนั้นโคลนผลผลิต PCR นี้ เข้าสู่ พลาสมิด pCR 2.1 vector แล้วนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดไปตรวจสอบการมีอยู่ของ insert โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*-HFTM พบดีเอ็นเอ 2 ชิ้น โดยชิ้นหนึ่งมีความยาวประมาณ 3.9 kb ของพลาสมิด pCR 2.1 vector และอีกชิ้นหนึ่งมีความยาวประมาณ 96 bp ของ *MrToll* จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCR 2.1-*MrToll* ไปหาลำดับดีเอ็นเอ ตรวจสอบความถูกต้องของ ORF และการแปลรหัสเป็นโปรตีน พบว่า ลำดับดีเอ็นเอของ insert *MrToll* มีความคล้ายสูง (high similarity) กับบริเวณ TIR domains ของ TLRs ในกุ้งชนิดต่างๆ

เนื่องจากลำดับดีเอ็นเอที่ได้จาก *MrToll* มีความยาวเพียง 96 bp จึงจำเป็นต้องนำลำดับดีเอ็นเอที่ได้มาออกแบบ gene specific primer และ degenerate primer อีกครั้งเพื่อนำไปทำ PCR หาลำดับดีเอ็นเอขนาดที่ยาวขึ้น โดยผลิต PCR ของ *MrToll* ที่ได้มีความยาว 627 bp (ภาพประกอบ 13) จากนั้นนำข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของ *MrToll* ความยาว 96 bp มาหาบริเวณที่ overlap กับลำดับ ดีเอ็นเอของ *MrToll* ความยาว 627 bp แล้วรวมข้อมูลลำดับดีเอ็นเอส่วนที่ overlap กันได้เป็นดีเอ็นเอขนาดยาวขึ้น นำข้อมูลลำดับดีเอ็นเอที่ได้ไปออกแบบ gene specific primer สำหรับหาลำดับ ดีเอ็นเอที่ครบสมบูรณ์

Litopenaeus	YSVTLNLMNNSLANFDGLDHPFYTRLAN LTIPY NKISHISESDLPGNLKVLVDVRGNLTF
Fenneropenaeus	YSITLNLNMNNSIANFDGLDHPFYTRLAN LTIPY NKISHFNKSDLPDNLKVLVDVRGNLTF
Marsupenaeus2	FSVTLNLMNNNITNFDGLEHPFYSKLVN LTIPY NKISHFNESDLPEHLKVLVDVRGNLTL
Penaeus	-----LKVLDVRGNLTF
Marsupenaeus	YSLTLNLRNNSISNLDQLQDPEYHNLVN LTIP NSLFSLNESTLPSSLRVLDIRGNFTY *:***:****:*
Litopenaeus	LSDTTLDYLNVTDVVLSLGDNPWTCNCMDIDFFTFLQVPERKVLDSSNNIKCASDGELLLS
Fenneropenaeus	LSASTLDYLNVTAMTSLSLGDNPWICNCIDIIDFSTFLQVPERKVLDPNNIKCASDGEELLG
Marsupenaeus2	LSATTLDYLNVTDMTSLSLGDNPWTCNCELIDFFTFLQVPERKVLDQNNIKCASDGEELLN
Penaeus	LSATTLDYLNVTDMTSLSLGDNPWTCNCMDIDFFTFLQVPERKVLDSSNNIKCASDGEELLN
Marsupenaeus	FEESVIDYFNKTDIILSLGENPWVCDCELIDLQSFLRVQEMKVLDFHNIIRCINFNETLVD :. :.:**:* * : ****:*** *:*:** :**:* * **** :**:* . . * :.
Litopenaeus	ISEYTICPSFRNPMVIVTIVLITVFLLLFAVLGTMSFYKYKQGIKVWLFTHRMCLWAITE
Fenneropenaeus	NNEYTMCPSPFRQRMVIVTIVLITVFLLLFAVLGTMSFYKYKQGIKVWLFTHRMCLWAITE
Marsupenaeus2	INEYTICPSFRQPMVIVTIVLITVFLLLFAVLGTMSFYKYKQGIKVWLFTHRMCLWAITE
Penaeus	INEYTICPSFRQPMVIVTIVLITVFLLLFAVLGTMSFYKYKQGIKVWLFTHRMCLWAITE
Marsupenaeus	VTEADLCPIILLPPKVI IASTVISMFLILSGVLATVSFWEYKQGIKVWLFTHRLCLWAVVN . * : ** : ****: . :*:**:* . **.*:***:*****:****:..
Litopenaeus	DELDADKKYDAFISYSHKDEEFVNTVLVPGLESGNPKYRI CLHYRDW IPGEYIQNQILQS
Fenneropenaeus	DELDADKKYDAFISYSHKDEEFVNTVLVPGLESGDPKYRI CLHYRDW IPGEYIQNQIMQS
Marsupenaeus2	DELDADKKYDAFISYSHKDEEFVNTVLVPGLESGDPKYRI CLHYRDW IPGEYIQNQILQS
Penaeus	DELDADKKYDAFISYSHKDEEFVNTVLVPGLESGAPKYRI CLHYRDW IPGEYIQNQILQS
Marsupenaeus	EEYDNNKKYDAFISYSDKVEEFVNTVLVPGLESGDPKYKV CLHYRDW LPGAYIQQQINQS :* * :*****.* *****.***** ***:*****:***:*** **
Litopenaeus	VEDSRRT IVVLS SNFIESVWGQLEFKAHSAALQDRTNRIIVIVYGQVPPPESELDEKLRL
Fenneropenaeus	VEDSRRT IVVLS SNFIESVWGQLEFKAHSAALQDRTNRIIVIVYGQVPPPESELDEKLRL
Marsupenaeus2	VEDSRRT IVVLS SNFIESVWGQLEFKAHSAALQDRTNRIIVIVYGQVPPPESELDEKLRL
Penaeus	VEDSRRT IVVLS SNFIESVWGQLEFKAHSAALQDRTNRIIVIVYGQVPPPESELDEKLRL
Marsupenaeus	VEASRR IVVLS SNFIENWGHLEFKTAHYQALKDRHNRIIVIVLGEVPPPENELDEELKL ** *****.***:***:*** ***:** ***** *:****.*****:***
Litopenaeus	YISMKTYVKWDAKFWEKLRYPHPPQELIQKKQKQKNRNDKLELVKSNSKSV-
Fenneropenaeus	YISMKTYVKWDAKFWEKLRYPHPPQELTQKKQKQCINADKLELVKSNSKNV-
Marsupenaeus2	YISMKTYVKWDAKFWEKLRYPHPPQELIQKKQKCKNADKLELVKSNSKSV-
Penaeus	YIS-----
Marsupenaeus	YLSTRTYLQFGDPKFWEKLRYPHPPYDLIYKKQRKRRDTDKLELVKSDSKESK *:*

ภาพประกอบ 11 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ Toll receptor ในกุ้ง

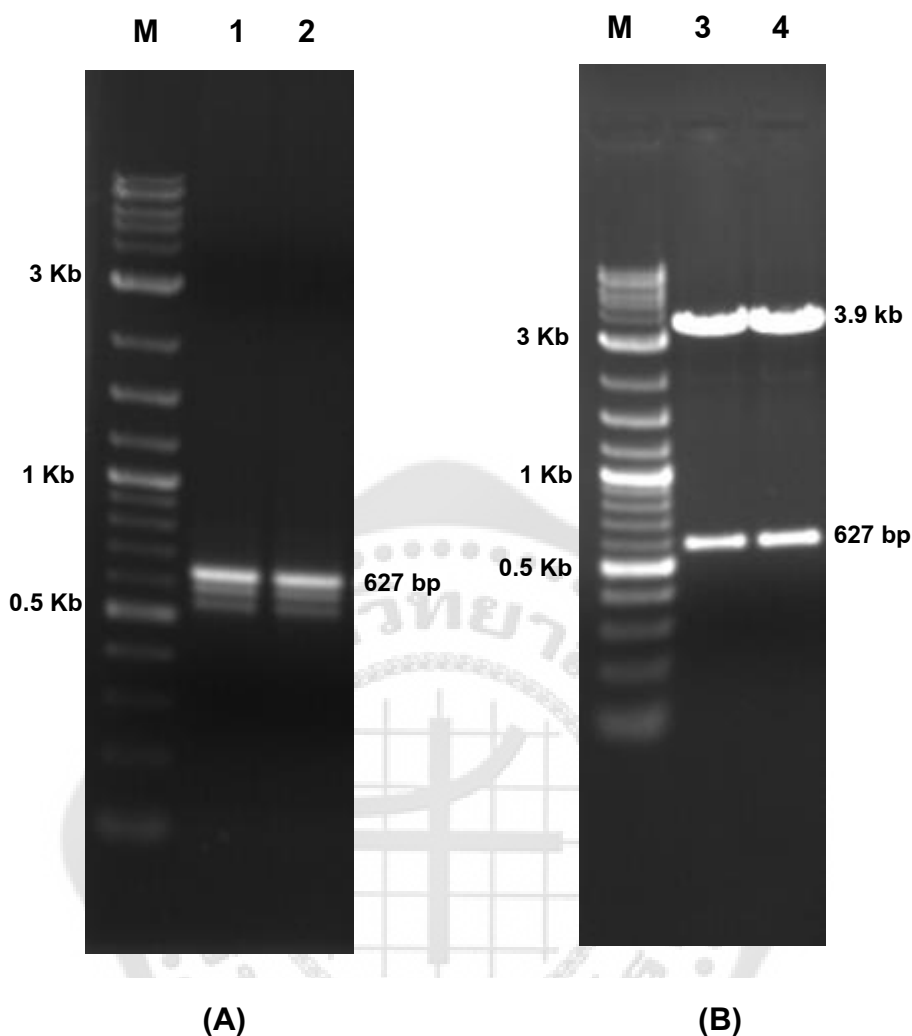
L. vannamei (Protein ID: ABK58729), *F. chinensis* (Protein ID: ABQ59330), *M. japonicus* (Protein ID: BAF99007), *M. japonicas 2* (Protein ID: BAG68890) และ *P. monodon* (Protein ID: ABO43764.1) ด้วยโปรแกรม ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) โดยเครื่องหมายลูกศรแสดงตำแหน่งและทิศทางของลำดับกรดอะมิโนที่นำไปใช้ออกแบบ degenerate primers ที่ใช้ในการทดลอง โดยชื่อของ primer กำกับอยู่บนลูกศร



ภาพประกอบ 12 ผลผลิต PCR ของ MrToll

คอลัมน์ที่ 1 และ 2 คือ ผลผลิต PCR ของ *MrToll* ขนาด 96 bp

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (2-log DNA ladder)



ภาพประกอบ 13 การโคลนและการหาลำดับ cDNA บางส่วนที่มีความยาวมากขึ้นของยีน *MrToll*

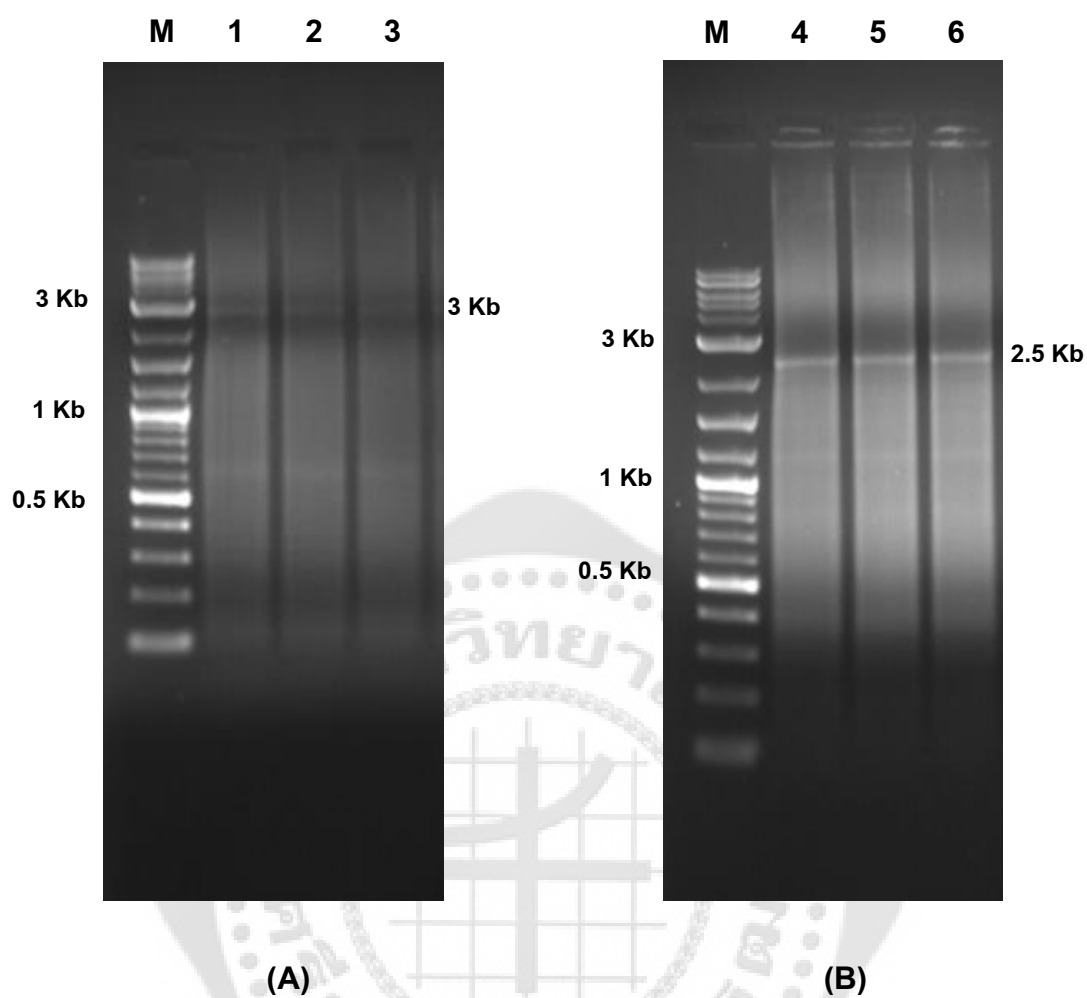
(A) คอลัมน์ที่ 1 และ 2 ผลผลิต PCR ของ *MrToll* จาก gene specific primer และ degenerate primer ขนาด 627 bp

(B) คอลัมน์ที่ 3 และ 4 การวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCR 2.1 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*-HFTM โดยพลาสมิด pCR 2.1 มีขนาดประมาณ 3.9 kb ส่วน *MrToll* มีขนาด 627 bp

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (2-log DNA ladder)

1.2 การหาข้อมูลลำดับ cDNA ทางปลาย 5' และปลาย 3' โดยวิธี RACE ของยีน *MrToll*

ผลการสังเคราะห์ 5'-RACE ของ *MrToll* มีความยาว 3,000 bp แต่เนื่องจากปริมาณผลผลิตที่ได้ไม่เพียงพอในการโคลนเข้าสู่พลาสมิดจึงจำเป็นต้องทำ nested 5'-RACE ซึ่งได้ผลผลิตที่มีความยาว 2,500 bp (ภาพประกอบ 14) ส่วนผลการสังเคราะห์ 3'-RACE ของ *MrToll* มีความยาว 1,500 bp (ภาพประกอบ 15) จากนั้นโคลนผลผลิต 5'-RACE และ 3'-RACE ของ *MrToll* ที่ได้เข้าสู่ พลาสมิด pCR 2.1 vector นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดไปตรวจสอบการมีอยู่ของ insert โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*-HF™ โดยชิ้นหนึ่งมีประมาณ 3.9 kb ของพลาสมิด pCR 2.1 vector และอีกชิ้นหนึ่งความยาวเท่ากับผลผลิต PCR ที่ถูกโคลน จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดไปหาลำดับดีเอ็นเอแล้วนำข้อมูล 5'-RACE และ 3'-RACE ของ *MrToll* ที่ได้มาหาบริเวณที่ overlap กันเพื่อรวมข้อมูลเป็นลำดับดีเอ็นเอของ *MrToll* ที่สมบูรณ์ จากนั้นตรวจสอบความถูกต้องของ ORF และการแปลรหัสเป็นโปรตีน พบว่าลำดับดีเอ็นเอของ *MrToll* มีความยาว 4,352 bp มีความคล้ายสูงกับ TLRs ของกิ้งกชชนิดต่างๆ ซึ่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *MrToll* ที่วิเคราะห์ได้นี้ได้นำไปเก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank โดยรหัสของข้อมูล (accession number) คือ JF895474

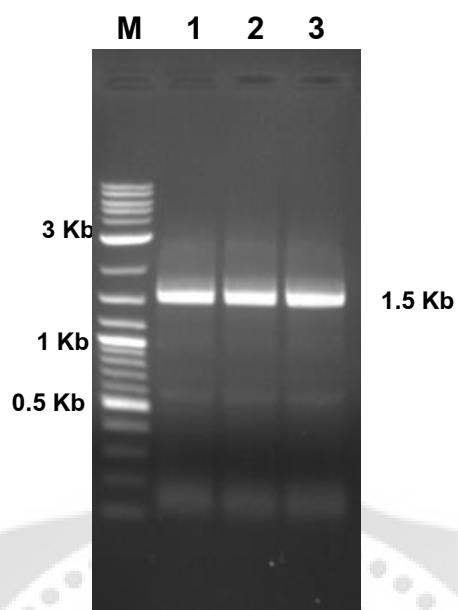


ภาพประกอบ 14 ผลการสังเคราะห์ 5'-RACE ของ *MrToll*

(A) ผลการสังเคราะห์ 5'-RACE ของ *MrToll* มีความยาว 3,000 bp

(B) ผลการสังเคราะห์ nested 5'-RACE ของ *MrToll* มีความยาว 2,500 bp

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (2-log DNA ladder)



ภาพประกอบ 15 ผลการสังเคราะห์ 3'-RACE ของ *MrToll*
คอลัมน์ที่ 1 ถึง 3 คือ 3'-RACE ของ *MrToll* มีความยาว 1,500 bp
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (2-log DNA ladder)

1.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีน MrToll

เมื่อนำข้อมูลลำดับดีเอ็นเอและกรดอะมิโนของ MrToll ที่สมบูรณจากการแปลรหัสยีนทั้งสองแล้วมาวิเคราะห์บริเวณ signal peptide วิเคราะห์บริเวณ extracellular domain, transmembrane domain, cytoplasmic domains วิเคราะห์ตำแหน่ง Potential N-linked glycosylation sites, regulatory motifs ของ putative promoter region และองค์ประกอบต่างๆ ให้ผลดังนี้

cDNA ของ MrToll มีความยาว 4,352 นิวคลีโอไทด์ โดย 5' untranslated region (5'-UTR) และ 3' untranslated region (3'-UTR) มีความยาว 369 นิวคลีโอไทด์ และ 1,184 นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ และพบ putative polyadenylation signal sequence มีลำดับ AATAAA ที่บริเวณ 3'-UTR เหนือจาก poly-A tail 18 นิวคลีโอไทด์ นอกจากนี้พบว่า ATG start codon ที่ตำแหน่ง +1 มีลำดับเบสดังนี้ GGAATGA ซึ่งตรงกับบริเวณ Kozak consensus sequence (A/GCCAUGG) ของ initiation codon ใน eukaryotic translation sites อยู่ 4 ใน 7 ตำแหน่ง โดย MrToll มี ORF ยาว 2,799 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นสายโพลีเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 932 หน่วย และยังพบบริเวณ nuclear factor-kappa B (NF- κ B)-like element อยู่บริเวณปลาย 5'-UTR ที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง -165 ถึง -156 (GaCAAGTCCC) (ภาพประกอบ 16)

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนไม่พบ signal peptide ที่ปลาย 5' ของ MrToll และ MrToll จัดเป็น typical type I membrane protein กล่าวคือ เป็นโปรตีนที่มีปลาย N ของสายโพลีเปปไทด์อยู่ภายนอกเซลล์ ส่วนปลาย C ของสายโพลีเปปไทด์อยู่ในไซโตพลาสซึม

บริเวณ extracellular domain ของ MrToll พบองค์ประกอบของกลุ่มกรดอะมิโน 24 หน่วยเรียงตัวซ้ำๆ กัน ที่เรียกว่า leucine-rich repeat (LRR) ซึ่งเรียงตัวซ้ำกัน 15 ซ้ำ (15 LRRs) โดยบริเวณ LRR เริ่มจากกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 155-670 (ภาพประกอบ 17 และ 20) นอกจากนี้ที่บริเวณ LRR ของ MrToll พบโครงสร้างของ cysteine-rich capping ซึ่งเป็นกรดอะมิโน cysteine จำนวน 20 residues ที่ปลาย amino (LRR N-terminal domain; LRR-NT) และปลาย carboxyl (LRR C-terminal domain; LRR-CT) ของ LRR นอกจากนี้พบกรดอะมิโนที่บริเวณ LRR-CT 2 บริเวณ คือ กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 496-502 และ 681-687 เรียงลำดับดังนี้ NPXXC(N/D)C โดย X แทนกรดอะมิโนใดๆ N แทนกรดอะมิโนแอสปาราจีน (asparagine) P แทนกรดอะมิโนโพรลีน (proline) C แทนกรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) และ D แทนกรดอะมิโนแอสปาร์ติก (aspartic acid) (ภาพประกอบ 16)

บริเวณ transmembrane glycoproteins พบกรดอะมิโน 23 หน่วย ที่ตำแหน่ง 735-757 และ บริเวณ cytoplasmic signaling domain หรือ cytoplasmic Toll/interleukin-1R (TIR) domain พบกรดอะมิโน 139 หน่วย ที่ตำแหน่ง 788-926 นอกจากนี้พบ N-linked glycosylation sites 9 ตำแหน่ง อยู่บริเวณ ectodomain อีกด้วย (ภาพประกอบ 16 และ 20)

ลำดับกรดอะมิโนบริเวณ LRR ของ TLRs เป็นบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโน ที่มีการเรียงตัวซ้ำๆ ร่วมกันและมีการจัดเรียงกันเป็นกลุ่มโดยมีจำนวนกรดอะมิโน 24 หน่วย เรียงเป็นลำดับดังนี้

x-L-x-x-L-x-L-x-x-N-x-φ-x-x-φ-x-x-x-x-F-x-x-L-x

โดย x แทนกรดอะมิโนใดๆ φ แทนกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic L แทนกรดอะมิโนลิซีน (leucine) และ F แทนกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) แต่บางครั้ง F และ L จะถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic residue อื่นๆ จากการวิเคราะห์บริเวณ LRR ของ MrToll นอกจากพบ LRR เรียงซ้ำกัน 15 ซ้ำแล้ว ยังพบว่ามีการดัดแปลง 15 หน่วย แทรกอยู่ที่บริเวณ LRR10 (ภาพประกอบ 17)

จากการวิเคราะห์ ORF ของ MrToll พบว่าร้อยละ 49 มีความเหมือน (identity) กับ MjToll1 ของ *M. japonicus* (accession no. BAG68890.1) PmToll ของ *P. monodon* (accession no. ABO38434.1) และ LvToll1 ของ *L. vannamei* (accession no. ABK58729.1) ร้อยละ 48 มีความเหมือนกับ FcToll ของ *F. chinensis* (accession no. ABQ59330.1) ร้อยละ 45 มีความเหมือนกับ MjToll2 ของ *M. japonicus* (accession no. BAF99007.1) ร้อยละ 44 มีความเหมือนกับ LvToll2 ของ *L. vannamei* (accession no. AEK86516.1) และร้อยละ 28 มีความเหมือนกับ LvToll3 ของ *L. vannamei* (accession no. AEK86517.1) (ภาพประกอบ 18) อย่างไรก็ตามการเปรียบเทียบบริเวณ TIR domain ของ MrToll แสดงให้เห็นว่ามีความคล้ายสูง (high similarity) กับบริเวณ TIR domain ของกุ้งชนิดอื่นๆ โดยร้อยละ 89 มีความเหมือนกับ MjToll1 และ PmToll ร้อยละ 88 มีความเหมือนกับ FcToll และ LvToll1 ร้อยละ 75 มีความเหมือนกับ MjToll2 ร้อยละ 73 มีความเหมือนกับ LvToll2 และร้อยละ 53 มีความเหมือนกับ LvToll3

นอกจากนี้พบว่า TIR domain มีบริเวณอนุรักษ์ 3 บริเวณ คือ บริเวณที่มีกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน แอสปาร์ติก อะลานีน (FDA) ตำแหน่งที่ 789-791 โปรีลีน(P) ตำแหน่งที่ 829 และฟีนิลอะลานีน ทรีปโตเฟน (FW) ตำแหน่งที่ 915-916 (ภาพประกอบ 16 และ 19) จากการวิเคราะห์บริเวณ ectodomain พบว่าส่วนใหญ่บริเวณ LRR ถูกขนาบด้วย LRR-CT และ LRR-NT โดยมีความเหมือนร้อยละ 77 ถึง 92 ในกลุ่ม Toll1 type (LvToll1 FcToll MjToll1 และ PmToll) และพบว่า ectodomain ของกลุ่ม Toll1 มีความเหมือนเพียงร้อยละ 33 ถึง 39 กับกลุ่ม Toll2 type (LvToll2 และ MjToll2) เป็นที่น่าสนใจว่า ectodomain ของ MrToll มีความเหมือนกับกลุ่ม Toll1 และ Toll2 เพียงร้อยละ 37 ถึง 39 เท่านั้น และมีความเหมือนร้อยละ 29 กับ LvToll3 (ภาพประกอบ 18)

-369 AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGGCGAGTCGTCCGACAGGTGTATCGACGATAGGACGTTGTT
 -300 CTAGGATTGTGTCTCTCCCGTGAAATTATAACTTCCAGCTAGTGACAGTGGCTTAATCTGACGAGTTT
 -231 TGTGTTTTGCGAACGTGTTGTGATTCCAGGATTCAATTTTTAGACAGTTTTGTACTGTTGAAAAGCAAGAC
 -162 AAGTCCCCGAACAGTGCTCAGGATTTTCGCTGGCCCTTGTTGTAGGAGTCGGAGTGCCAGCGAACCTTT
 -93 ACAGCAGAGTATATTTATCCGTAGGGGGATTCTGTTTTACCCACACATGGCAGCTCGTACACCAGTCGG
 -24 AAGAACGTGCGAGGGGCACACGGGAATGATCAAGGGACTGACGGTTAGCTGTGATGTTAGTTGGCCCTCTC
 1 M I K G L T V S C D V S W P L
 46 GTGACCTACCACCAATGGCCGCTGGAAGTGCCTGCCCCGCTCCTATTGTTGGTATGGGGTGGCGGGC
 16 V T Y H Q W P P G S A [C] P P S Y [C] W Y G V A G
 115 GGGATCAGCACCACCACCACAACCAGGACTTGCGGTAATTGTAAGGAAAATGGGAATTACGTCCTTTGT
 39 G I S T T T T T R T [C] G N [C] K E N G N Y V L [C]
 184 CGTCATTCTGCGGGAGGAGACGTATACGAGGTGGAGGTCTCATGGAACCGAGCTGCTCCTGCAGTGC
 62 R H S A G G D V Y E V E V L M E T E L L L Q [C]
 253 AAGCCATCGACGACAAACCTCAACTTGACCTTCATGGAGGGCTGCAGCTTCCCCCTCCGTCGAGCAGATC
 85 K P S T T N L (N) L T F M E G [C] S F P S V E Q I
 322 AAGGTTTACGGGTGCCCCCTTGCCCAACGCGTCTTTGGGGAGCTGTTCTTCCAGATGGGGGTGTACCCG
 108 K V Y G [C] P L P N A S F G E L F F Q M G V Y P
 391 GAAAACGTCAACACATTTGGCTTCTACGACCGCAACGAGCGAGATCGGCCGCTCGAGGGCTGGCATTG
 131 E (N) V T T F G F Y D R N E R D R P L E G W H L
 460 GATGGACTTGAGGGCTTACTGACCTCGAGTTTGTGAACAATGACTTCCTTGATTGCCAGTGGATCTG
 154 D G L E G L L T L E F V N N D F L G L P V D L
 529 TTCCTCCCACTCCGAGCCTGAGGAGAATTAAGGTGGTCTCAGACAGTTTCAGCTCATTGCCAGAGTCG
 177 F T P T P S L R R I K V V S D S F S S L P E S
 598 ATATCTTTAATTTGCCAGACTTAGAAACCTCGAAGTTTGAAGAAACAGGCTGGAGACTTTACCGCCA
 200 I F F N L P D L E T S N F E R N R L E T L P P
 667 GGGCTTTTACTAATTTGACAGCTTAAACGAATGTTACTCTCTCATAACTATCTATCTTCAGTTGAC
 223 G L F T (N) L T A L T (N) V T L S H N Y L S S V D
 736 CCCGATTTTTTTAGTGATAAGGTTAATTTGGAAAGCTTAGATCTAAGTCACAATCAAATAGCTTCGTTG
 246 P D F F S D K V N L E S L D L S H N Q I A S L
 805 GAGAGAAACATTTTCGAAAATCTTGGTCTCTCAGAACTTATCAATGCAAGGAAACCTCTTGAAAGT
 269 E R N I F E N L G A L R (N) L S M Q G N L L E S
 874 TTACCCAGTGGTGTCTTTTCTAACTTTTGTCTCTGGAAGCTCTTGACCTTAGTTTCAATGTTCTTAGA
 292 L P S G V F S K L L S L E A L D L S F N V L R
 943 CAGTTGCCAGAGAAAGCCTTTGACAGGCTGATAGATGTGAAGAATATCGATCTTAGCAATAACCTCGAT
 315 Q L P E K A F D R L I D V K N I D L S N N S L
 1012 AGCGAATTACCCAGTGAAGCATTCAAGTGTGAATCTTTGGCAAGGTTGTCTAATAAGACATAATGAC
 338 D E L P S E A F S K C E S L A R L S L R H N D
 1081 CTCGAAAACTTCAAGCCGAAATGTTTCTAGGCAGACGTCTTTAACCTTTCTGGATTTGGGTGATAAT
 361 L E K L Q A E M F P R Q T S L T F L D L G H N
 1150 AATATCTCTTTACGGTTAATTCAGCAAAAATTCTCCAGGAAGGGCCAGTCTCATACGAGGGTAATTTT
 384 (N) I S F T V N S A K I L Q E G P V S Y E G N F
 1219 CCTCTTAATTCTCAAATCAAATTACAAGAACTCCTTATGAATGACAACAAAATTGACTTCATACCATCG
 407 P L N S Q I K L Q E L L M N D N K I D F I P S
 1288 GCTATAAATAATATATTTGTGGATCTAAAGAAGTTGATCTCTCTGGAAATGAAATTACCGATTTTTCC
 430 A I N N I F V D L K K V D L S G N E I T D F S
 1357 TACCACTCTCTGGTGTCTATCAAGATTCTGTTATACTGAATCTAAAGAATAACAATATCAGCTATGTT
 453 Y H S L V F Y Q D S V I L N L K N N (N) I S Y V
 1426 GATTTCCACGAGATTTGTGATCTCCTGAATGAAAAAGAAGTGAAATTGTACCTTGAGGAAATAACTTG
 476 D F H E I C D L L N E K E V K L Y L E G N N L
 1495 TTCTGCGATTGTAGAATGTACCTATTCACCAGGATTGTTCAAGGACAACCTATAATGAAGATGAAAATC
 499 F [C] D [C] R M Y L F T R I V Q G Q P I M K M K I
 1564 ATGGACATTGAGGTGGAGGACATAGAAAAGGTTACCTGTGCGAATCATGACGGTATCCAACAACCTCTTG
 522 M D I E V E D I E K V T [C] R N H D G I Q Q L L

1633 TCACAGGTAGATTGACACAGCTCTACTGTGTCATACCAGATGTGCAGTGCATCAGAAATTGCTCATGC
 545 S Q V D S T Q L Y [C] V I P D V Q [C] I R N [C] S [C]
 1702 TTGTGGCGTGACACGACTATATGGTCATTATTGACTGTTCCCTTCTGGGACTTCAGGAGCTCCCTGAC
 568 L W R A H D Y M V I I D [C] S F L G L Q E L P D
 1771 CTGAGTATACTCTCAAAGCCCCATGCTAAAAATATCAGTTACTCTGGATATGAAGAACAACAGTTTATAC
 591 L S I L S K P H A K I S V T L D M K N N S L Y
 1840 ACTCTGAAAGGGCTGAAAGATCCCCAGTTTGCTAATTTAGTGAACCTGACAATCCATACAACAAAATA
 614 T L K G L K D P Q F A N L V (N) L T I P Y N K I
 1909 TCATTCAATGAATCTGATATCCCAACCAGTTTGAAGGTTCTAGATGTCAGAGGAAATGAGCTCACA
 637 S F I N E S D I P T T L K V L D V R G N E L T
 1978 AATATTCAGAACAGTGTAGAGTTCTGAATGCCACAGATATGATCCTAAGTTTTAGTGGAAATCCA
 660 N I P E P V L E V L (N) A T D M I L S F S G N P
 2047 TGGGACTGTGACTGTGATTTTATCAACTTCTGTAATTTCTTGACACACCTTCACGGAAAGTCACAGAC
 683 W D [C] D [C] D F I N F L N F L H T P S R K V T D
 2116 TTTGATGAAATCACTTGTGCACGGGGCAATGTGTATCTACACGATTTAACAGAATATTCACTTTGCCT
 706 F D E I T [C] A R G N V Y L H D L T E Y S L [C] P
 2185 TACTTCATGCAGCCAATGGTCATTGTCACTCTGTGTGCAATGGTGCATTCCCTATTATTCTTCGCAGTT
 729 Y F M Q P M V I V T L V A I G A F L L F F A V
 2254 TTTGGTACTGTTAGCTTCTACAAGTACAAACAAGGCATTAAGGTTTGGTGTATGCACATCGGATGTGT
 752 F G T V S F Y K Y K Q G I K V W L Y A H R M C
 2323 CTGTGGGCCATCAGAGAAGATGAAATGGATGCAGACAAGAAATTTGATGCTTTTCATAAGTTATTCCCAC
 775 L W A I T E D E M D A D K K F D A F I S Y S H
 2392 AAGGATGAAGAATTTGTCAACACAGTTTTTGGTCCCTGGGCTTGAAAATGGGGATCCAAAGTACCGAATA
 798 K D E E F V N T V L V P G L E N G D P K Y R I
 2461 TGCCTTCACTATAGAGACTGGGTACCTGGAGAGTACATTCAAATCAGATTCTTCAGAGTGTGGAAGCC
 821 C L H Y R D W V P G E Y I Q N Q I L Q S V E A
 2530 AGTCGACGAACATTTTCGTGCTCTCATCCAATTCATTGAGAGTGCCTGGGGCCAGTTGGAATCCGAAG
 844 S R R T I V V L S S N F I E S A W G Q L E S K
 2599 GCAGCACATTCTCAGGCTTTGCAAGATGGAAGTACAGAAATCATAGTCATTGTGTATGGGGAAATTTCCC
 867 A A H S Q A L Q D G T S R I I V I V Y G E I P
 2668 CCTGAAAGCGAGCTGGATGATAAACTGCAGTTGTACATCTCTACTAAAACCTACGTGAAATGGGGAGAT
 890 P E S E L D D K L Q L Y I S T K T Y V K W G D
 2737 GCCAAATTTTGGGAGAAGCTTTGTTATTTTCATGCCCTCATCCACGAAAAAGCTGAACAATTAAGCGATG
 913 A K F W E K L C Y F M P H P P K K L N N *
 2806 AAATAGTGACAGCCTGAATAAACTAGTGCAGATGGTATTTCAGGCTTATAGGACTGCTTAACCTGAAAAAT
 2875 ACCATGCTGAGCAAAGTTCGAGTGCTTGCCTCATAAGATTGCACTATCCTCGGTTTCATGAAAAGTCTTA
 3013 TAGCTCAAACTTATGGGAGGTGGCATTGATGAAAACCATTTCAAAGATTCTCAGTAAAGTGTTCCACGG
 3082 TGAATATTGTGTCATGTACAGTTTACATGAAAAAAATCTAACTTGAAGAAGTTTCAAATACACAGATA
 3151 TTTAGTGTGTAATAGTGGGAAGTATGCTTTGGGCTATATGTAGTAGCTCTGAACATTCATGCTTCTTT
 3220 ATTCGATAGCAACTGGTGCTTTTAAATGGTGGAAAATCGTAGTGGATAAAGAAGTGTAAAAAGTACAG
 3289 CATATCTTAATTAGTTTGTGAACACTGCCCTCGTATCATTTGTTTAAATTAAGCACATGTAAATAGGAATT
 3358 TTTTATACTGTACATAATTATAATGTTAAAGCAGCTGTTTCAGCTGGAGTAATGGATGTTTTAAGGTTGG
 3427 TACATATGTGGCAATTCTTTTTTGTCTTAAGTCTCCAGCAAGTTTATTAATACAGTAGTAGTACTGC
 3496 AATTTGCTTGTTTTATGGGGTGTCTTGGTGCAGTATTTTATCAATTAGCATTTAGACATACTAGACAAA
 3565 TCTTGGCTGTGATTTGATTTTAAATTTTTGTAGCAGTGGGAAAAAGTTAAGACTTTTGTGGAGAGGAT
 3634 TTTTCCACAAATGCTCTTTTTGTATTATGGCAAGTACTTTAATTCATGAAAAGACCACAAGGAATGTAA
 3703 AGATTTCTTCAAACCTTAAGGGCAGGGTGTATTAGTGCAGTTTCTTCTTTTATAGAGAAGGAACCTTGCAA
 3772 AACTTTGAAGCATCAGTGTTAAATTACCCTGTCGTCAACATGTACTGTACAGTGTAAACAAGATTTCC
 3841 ACTGCAGCTTTTAGTTACAGCACTATACAGTACTGTATAATATTTAAAAAAGAAAGATTGCCGTAAAT
 3910 TGCAATGCCTCATGCAATGGGAAAGGTTGTACAATTCCTACATGTTTTTAAGAATAAAAATTCTA
 3979 CTTGTAAAAA

ภาพประกอบ 16 ภาพแสดงลำดับ cDNA และลำดับกรดอะมิโนของ MrToll

โดยตัวเลขด้านซ้ายแสดงตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน รหัสอักษร (one-letter codes) ใต้ลำดับ cDNA แทนกรดอะมิโน อักษรตัวหนา คือ initiation codon (ATG) stop codon (TAA) และ poly-A site บริเวณที่ขีดเส้นใต้สองเส้น คือ NF- κ B-like element กรดอะมิโนซิสเทอีน ภายใน cysteine-rich regions แสดงในกรอบสี่เหลี่ยม Potential N linked glycosylation sites ภายในบริเวณ extracellular domain แสดงในวงกลม บริเวณที่ขีดเส้นใต้ คือ Transmembrane domain ตัวอักษรเอียงและขีดเส้นใต้ คือ บริเวณอนุรักษของ TIR domain โดยตัวอักษรหนาภายในบริเวณอนุรักษ คือ กรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน แอสปาร์ติก อะลานีน (FDA) โพรลีน (P) และฟีนิลอะลานีน ทริปโตเฟน (FW)



	1	5	10	15	20	25	Position (aa)
Consensus	xLxxLxLxxN			xϕxxϕxxxxFxxLx			
LRR1	GLEGLLTLEF			VNNDFLGLPVDLFTPTP			(155-181)
LRR2	SLRRIKVVS			SFSSLPESIFFNLP			(182-205)
LRR3	DLETNFERN			RLETLPGLFTNLT			(206-229)
LRR4	ALTNVTLSHN			YLSSVDPDFSDKV			(230-253)
LRR5	NLESIDLSHN			QIASLERNIFENLG			(254-277)
LRR6	ALRNLSMQGN			LLESPLSGVFSKLL			(278-301)
LRR7	SLEALDLSFN			VLRQLPEKAFDRLI			(302-325)
LRR8	DVKNIDLSNN			SLDELPEAFSKCE			(326-349)
LRR9	SLARLSLRHN			DLEKLQAEFFPQT			(350-373)
LRR10	SLTFDLGHNNISFTVNSAKILQEGPVSYEGNFPLNSQI						(374-412)
LRR11	KLQELLMDN			KIDFIPSAINNIFV			(413-436)
LRR12	DLKKVDLSGN			EITDFSYSLSLVFYQ			(437-460)
LRR13	DSVILNLKNN			NISYVDFHEICDLL			(461-484)
LRR14	NLVNLTIPTN			KISFINESDIPT			(625-646)
LRR15	TLKVLDVRGN			ELTNIPEPVLEVLN			(647-670)

ภาพประกอบ 17 ลำดับกรดอะมิโนบริเวณ LRR ของ MrToll

เริ่มจากกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 155-670 โดยบริเวณอนุรักษ์ของ LRR ประกอบด้วยกรดอะมิโน 24 หน่วย เรียงเป็นลำดับดังแสดงในภาพแถบนี้ โดย x แทนกรดอะมิโนใดๆ , ϕ แทนกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic, L แทนกรดอะมิโนลิวซีน (leucine) และ F แทนกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) แต่บางกรณี F และ L จะถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic residues อื่นๆ

ORF	MrToll	LvToll1	FcToll	MjToll1	PmToll	MjToll2	LvToll2	LvToll3
Ectodomain								
MrToll		49	48	49	49	45	44	28
LvToll1	39		84	82	88	42	41	28
FcToll	38	80		83	94	48	42	28
MjToll1	39	77	78		87	47	42	29
PmToll	38	85	92	83		48	43	28
MjToll2	38	33	39	35	39		75	28
LvToll2	37	34	36	36	35	71		30
LvToll3	29	24	24	25	24	24	25	

ภาพประกอบ 18 การวิเคราะห์ความเหมือนของกรดอะมิโนของ (amino acid identity) ของ ORF และ ectodomain ของ MrToll เปรียบเทียบกับ Toll ของกุ้งชนิดต่างๆ

```

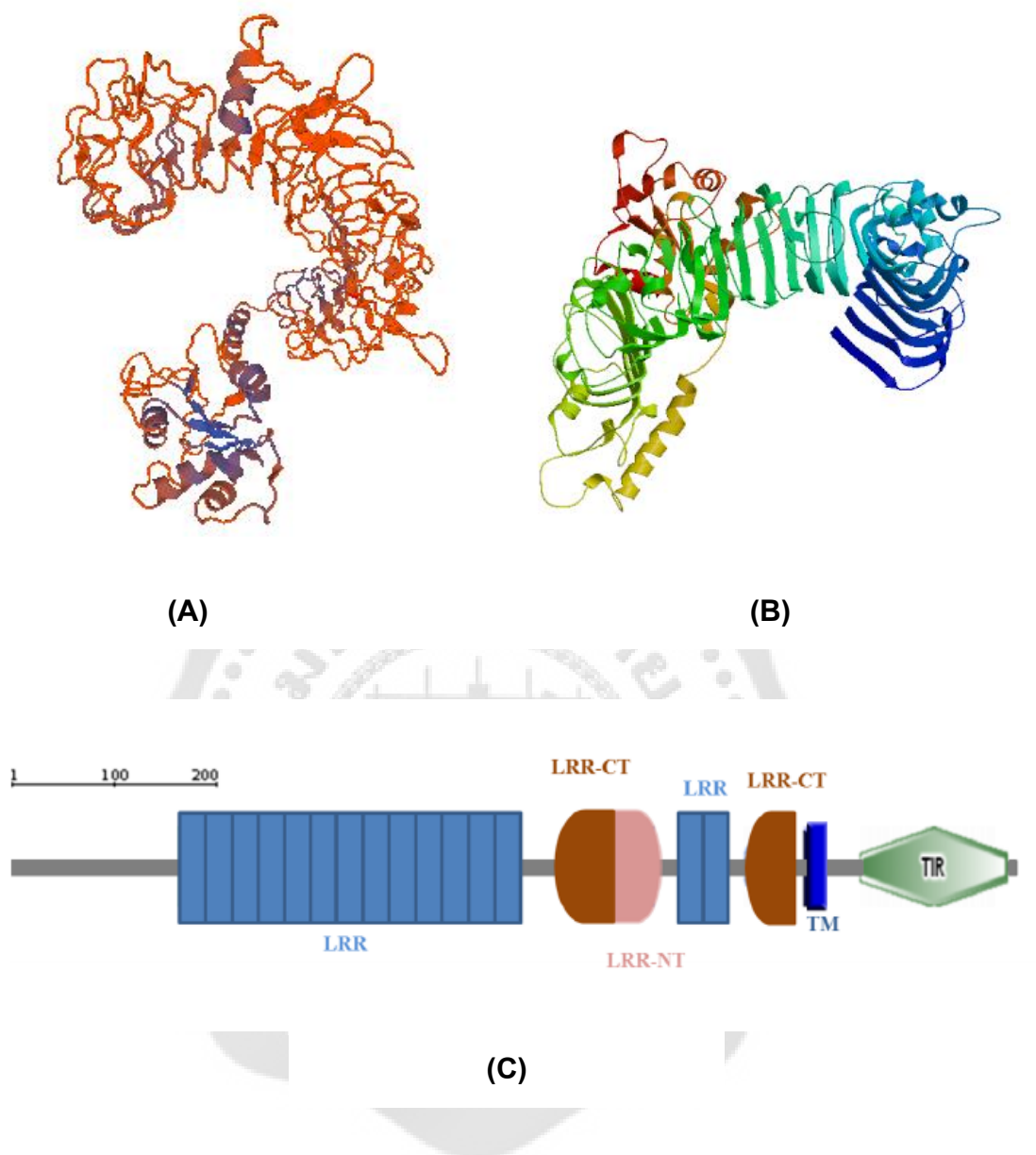
LvTol12 KYDAFISYSNKKDEEFVNSDLVPGLES GPKYKVC LHSRDWLP GAYIQQQITQSVEASRRT 57
MjTol12 KYDAFISYSKDEEFVNTVLVPGLES GPKYKVC LHYRDWLP GAYIQQQINQSVEASRRT 60
PmTol1 KYDAFISYSYSHKDEEFVNTVLVPGLES GPKYRIC LHYRDWIP GEYIQNQILQSVEDSRRT 60
MjTol11 KYDAFISYSYSHKDEEFVNTVLVPGLES GPKYRIC LHYRDWIP GEYIQNQILQSVEDSRRT 60
LvTol11 KYDAFISYSYSHKDEEFVNTVLVPGLES GPNPKYRIC LHYRDWIP GEYIQNQILQSVEDSRRT 60
FcTol1 KYDAFISYSYSHKDEEFVNTVLVPGLES GPKYRIC LHYRDWIP GEYIQNQIMQSVEDSRRT 60
MrTol1 KFDAFISYSYSHKDEEFVNTVLVPGLENGDPKYRIC LHYRDWVP GEYIQNQILQSVE-SRRT 59
LvTol13 LFDAFVSYSKKDEAWNVQVLAGELE RGRPYRVCLHYRDFVTAYIAETIVEAVESSRRT 59
:***:*** * * :*** * . ** *: **:*** **: ** : * :*** ****

LvTol12 IVVLSSNFIENVWGHLEFKTAHQALKDRHNRVIVIVLGEVPPENELDEELKLYLSTRTY 117
MjTol12 IVVLSSNFIENVWGHLEFKTAHQALKDRHNRVIVIVLGEVPPENELDEELKLYLSTRTY 120
PmTol1 IVVLSSNFIENVWQGLEFKAHSAQALQDRTNRIIVIVYGQVPPESSELDEKLRLYISMKT 120
MjTol11 IVVLSSNFIENVWQGLEFKAHSAQALQDRTNRIIVIVYGQVPPESSELDEKLRLYISMKT 120
LvTol11 IVVLSSNFIENVWQGLEFKAHSAQALQDRTNRIIVIVYGQVPPESSELDEKLRLYISMKT 120
FcTol1 IVVLSSNFIENVWQGLEFKAHSAQALQDRTNRIIVIVYGQVPPESSELDEKLRLYISMKT 120
MrTol1 IVVLSSNFIENVWQGLEFKAHSAQALQDGTSRVIVIVYGEIPESELDDKLQLYISTKT 119
LvTol13 IIVLSKNFIENWCRCFQFKSAHHEVLKRRQRLLIVIVLGEIPAR-DLDPDLRLYLKTNTC 118
*:***:****. * ::*:*** :*. . :*:*** *:*. . **:*. :*:***. . *

LvTol12 LQFGDPKFWEKLRYA---- 132
MjTol12 LQFGDPKFWEKLRYAMPHP 139
PmTol1 VKWGDAKFWEKLRYIMPHP 139
MjTol11 VKWGDAKFWEKLRYIMPHP 139
LvTol11 VKWGDAKFWEKLRYIMPHP 139
FcTol1 VKWGDAKFWEKLRYIMPHP 139
MrTol1 VKWGDAKFWEKLCYFMPHP 138
LvTol13 IYASDKFWEKLRFAMPD- 136
: . * ***** :

```

ภาพประกอบ 19 ภาพแสดงผลการ alignment โดยใช้บริเวณ TIR domain ของกิ้งก่ามกราม
เปรียบเทียบกับ TIR domain ของกิ้งก่าชนิดอื่นๆ พบว่า TIR domain จะมีบริเวณอนุรักษ์ที่มี
กรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน แอสปาร์ติก อะลานีน (FDA) โพรลีน (P) และฟีนิลอะลานีน
ทริปโตเฟน (FW)



ภาพประกอบ 20 ภาพจำลองแสดงโครงสร้างของโปรตีน MrToll

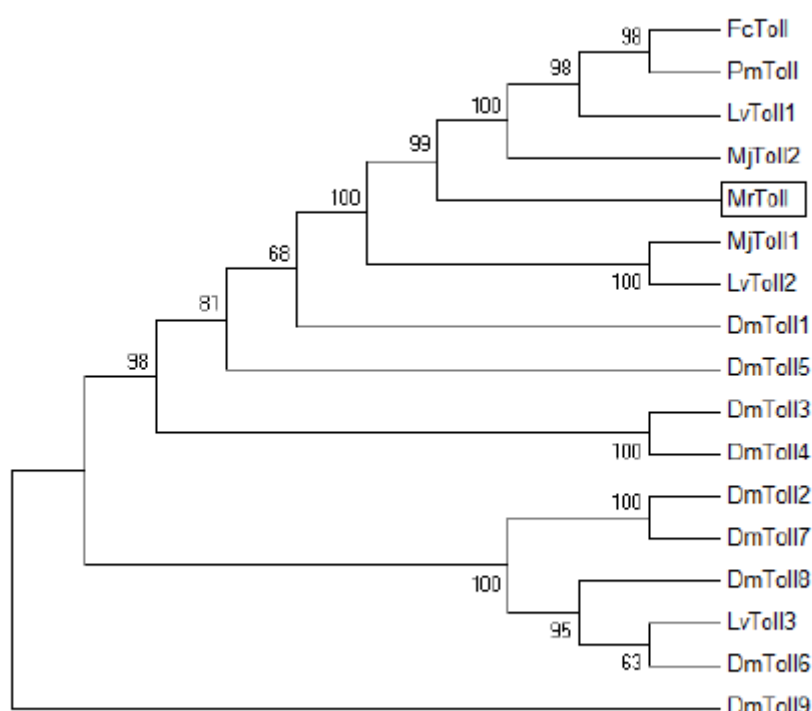
(A) และ (B) โครงสร้างของโปรตีน MrToll วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SWISS-MODEL

(<http://www.swissmodel.expasy.org>) โดยภาพ A แสดงลักษณะ horseshoe-shaped solenoid ของ MrToll ส่วนภาพ B แสดงสาย β -strand ของแต่ละ LRR ซึ่งโครงสร้างนี้อยู่ที่บริเวณ concave ของ solenoid

(C) ภาพวาดแสดงบริเวณต่างๆ ของ MrToll โดยกรดอะมิโนตำแหน่ง 1 ถึง 200 แสดงดังสเกล เมื่อ LRR แทน leucine-rich repeat LRR-NT แทน Leucine-rich repeat N-terminal domain LRR-CT แทน Leucine-rich repeat C-terminal domain TM แทน transmembrane domain TIR แทน Toll/Interleukin-1R domain

1.4 การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ MrToll

จากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ Toll receptor ในกุ้งชนิดต่างๆ โดยใช้ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Toll (full-length amino acid sequences) จากกุ้งชนิดต่างๆ และจากแมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) นำไปสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี neighbor joining และ Bootstrap 1,000 ครั้ง พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของ TLR family proteins ได้ 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย Toll receptor ของกุ้งยกเว้น LvToll3 ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ DmToll6 และ กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย Toll receptor ของแมลงหวี่ โดยที่ MrToll จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ FcToll PmToll LvToll1 และ MjToll1 (ภาพประกอบ 21)



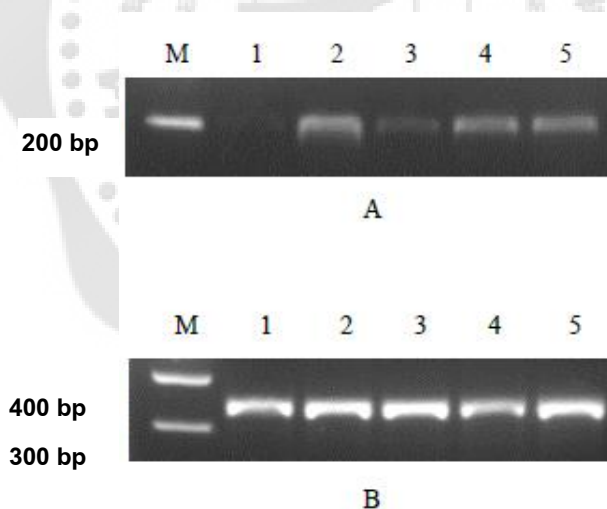
ภาพประกอบ 21 ภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ MrToll

จากการนำโปรตีน Toll receptor ในกุ้งและแมลงหวี่มาสร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธี neighbor joining โดยใช้โปรแกรม MEGA 5.0 software และ Bootstrap 1,000 ครั้ง โปรตีน Toll ของกุ้งที่นำมาศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการดังนี้ กุ้ง *L. vannamei* (LvToll1; accession No. ABK58729.1) กุ้ง *L. vannamei* 2 (LvToll2; accession No. AEK86516.1) กุ้ง *L. vannamei* 3 (LvToll3; accession No. AEK86517.1) กุ้ง *F. chinensis* (FcToll1; accession No. ABQ 59330.1) กุ้ง *M. japonicus* (MjToll1; accession No. BAG68890.1) กุ้ง *M. japonicas* 2 (MjToll2; accession No. BAF99007.1) กุ้ง *P. monodon* (PmToll;

accession No. ABO38434.1) และ กุ้ง *M. rosenbergii* (MrToll; accession No. JF895474) โปรตีน Toll ของแมลงหวี่ที่นำมาศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการดังนี้ แมลงหวี่ *D. melanogaster* 1 ถึง *D. melanogaster* 9 DmToll1 (accession No. AAA28941.1) DmToll2 (accession No. AAF57509.1) DmToll3 (Accession No. AF247769.1) DmToll4 (accession No. AAF52747.3) DmToll5 (accession No. AF247767.1) DmToll6 (accession No. AF247766.1) DmToll7 (accession No. AAF57514.1) DmToll8 (accession No. AF247764.1) และ DmToll9 (accession No. AAF 51581.1)

1.5 การศึกษาการแสดงออกของยีน *MrToll* ในอวัยวะต่าง ๆ ของกุ้งก้ามกรามโดยวิธี semi-quantitative reverse transcriptase PCR

จากผลการทำ RT-PCR เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *MrToll* ในอวัยวะต่าง ๆ ของกุ้งก้ามกรามโดยใช้อาร์เอ็นเอที่สกัดจาก gill, hepatopancreas, hemocytes, stomach และ muscle พบว่า ยีน *MrToll* มีการแสดงออกในอวัยวะต่าง ๆ ที่แตกต่างกัน โดยยีน *MrToll* มีการแสดงออกน้อยใน hepatopancreas และ gill แต่มีการแสดงออกสูงใน hemocytes, stomach และ muscle (ภาพประกอบ 22)



ภาพประกอบ 22 ผลผลิต PCR จากการทำ RT-PCR เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *MrToll*

คอลัมน์ที่ 1 ถึง 5 แสดงผลผลิต RT-PCR จาก hepatopancreas, hemocytes, gill, stomach และ muscle ตามลำดับ

(A) ผลผลิต RT-PCR ของยีน *MrToll* ขนาด 200 bp

(B) ผลผลิต RT-PCR ของยีน β -actin ขนาด 337 bp

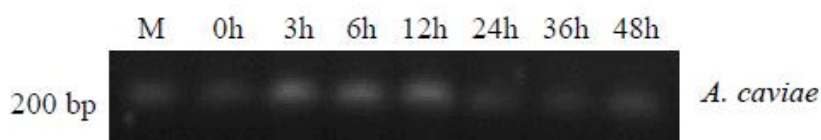
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (2-log DNA ladder)

1.6 การทดลอง immune challenge สำหรับยีน *MrToll*

จากการทดลองนำกุ้งก้ามกรามน้ำหนักตัว 40 ถึง 45 กรัมต่อตัว มาแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม สำหรับกลุ่มทดลอง ทำการฉีดเชื้อ *A. caviae* ความเข้มข้น 10^3 CFU/น้ำหนักตัว(กรัม)ของกุ้ง โดยฉีดตัวละ 50 ไมโครลิตร ขณะที่กลุ่มควบคุมฉีด 2XPBS ที่ปราศจากเชื้อตัวละ 50 ไมโครลิตร พบว่า กุ้งกลุ่มทดลองหลังจากฉีดเชื้อ *A. caviae* พบการแสดงออกของยีน *MrToll* เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย 2XPBS ซึ่งพบการแสดงออกของยีน *MrToll* ค่อนข้างคงที่ในทุกช่วงเวลา (ภาพประกอบ 23 A และ C) และพบว่าการแสดงออกของยีน *MrToll* ในกุ้งกลุ่มทดลองเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหลังจากฉีดเชื้อในช่วงเวลา 3 ถึง 12 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพประกอบ 23 B และ C) แต่อย่างไรก็ตามในช่วงเวลา 24 ถึง 48 ชั่วโมงหลังจากฉีดเชื้อระดับการแสดงออกของยีน *MrToll* จะไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม

ผลการนับจำนวนแบคทีเรียในน้ำเลือดกุ้ง (CFU/มิลลิลิตร) ที่เวลาต่างๆ กันหลังจากฉีดเชื้อ *A. caviae* พบว่า กุ้งกลุ่มทดลองสามารถนับจำนวนแบคทีเรียที่เวลา 3, 6, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง หลังจากฉีดเชื้อ โดยจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ คือ 6×10^5 , 4.8×10^5 , 4.6×10^5 , 4.8×10^6 , 1.9×10^6 และ 2.25×10^5 CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ขณะที่กุ้งกลุ่มควบคุมไม่พบแบคทีเรียบนอาหาร TSA ในทุกช่วงเวลา

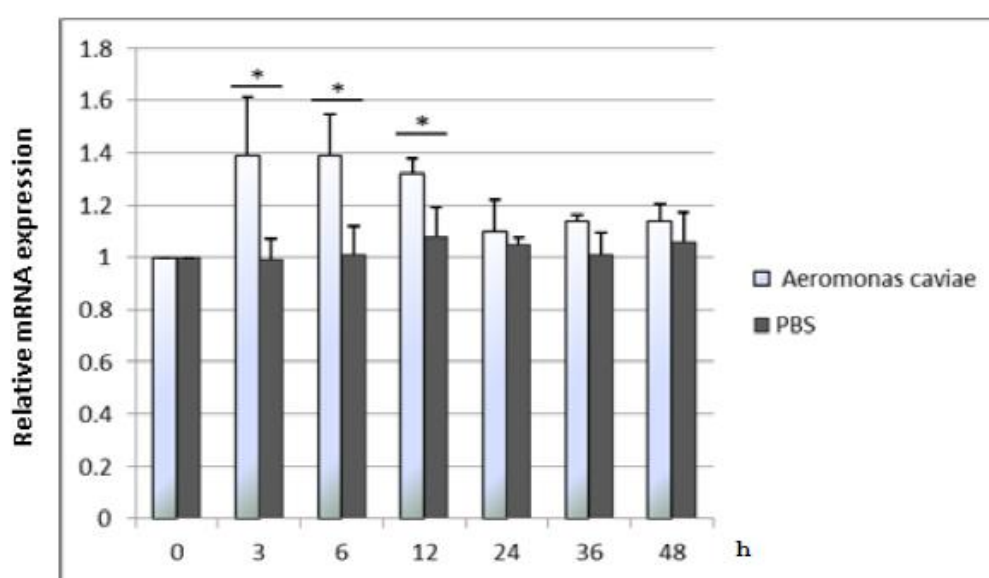
ผลการทำ colony PCR เพื่อทดสอบว่าโคโลนีที่เกิดขึ้นเป็นเชื้อ *A. caviae* พบว่า โคโลนีที่เกิดขึ้นบนอาหาร TSA เป็นเชื้อ *A. caviae* เนื่องจากให้ผลผลิต PCR ขนาด 237 bp ตามวิธีของ Payattikul (Payattikul; et al. 2015: 164-171) (ภาพประกอบ 24)



A



B



C

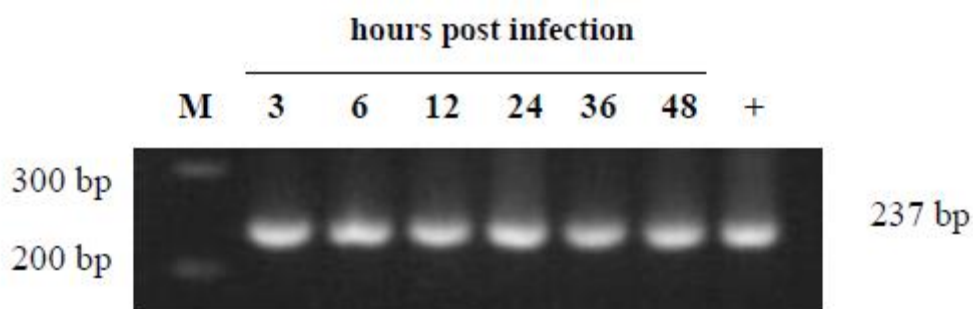
ภาพประกอบ 23 ผลผลิต PCR ขนาด 200 bp ของยีน *MrToll* และกราฟแสดงการแสดงออกของยีน *MrToll* ใน hemocyte ของกุ้งก้ามกรามในกลุ่มต่างๆ ที่เวลาแตกต่างกัน

(A) การแสดงออกของยีน *MrToll* ของกุ้งก้ามกรามที่ถูกฉีดด้วย *A. caviae*

(B) การแสดงออกของยีน *MrToll* ของกุ้งก้ามกรามที่ถูกฉีดด้วย PBS

(C) กราฟเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *MrToll* ที่เวลาต่างๆ ในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม และการแสดงออกของยีน *β-actin* โดยวิเคราะห์ข้อมูลเชิงปริมาณและนอร์มัลไลเซชัน (normalization) ข้อมูลด้วยโปรแกรม ImageJ software (<http://www.rsweb.nih.gov/ij/>) โดยแถบเหนือกราฟแสดงค่า mean $\pm$ SD จากตัวอย่าง 6 ตัว

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ของยีน *MrToll* ในกลุ่มที่ถูกฉีดด้วย *A. caviae* เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ถูกฉีดด้วย PBS ที่เวลาเดียวกัน ($P < 0.05$)



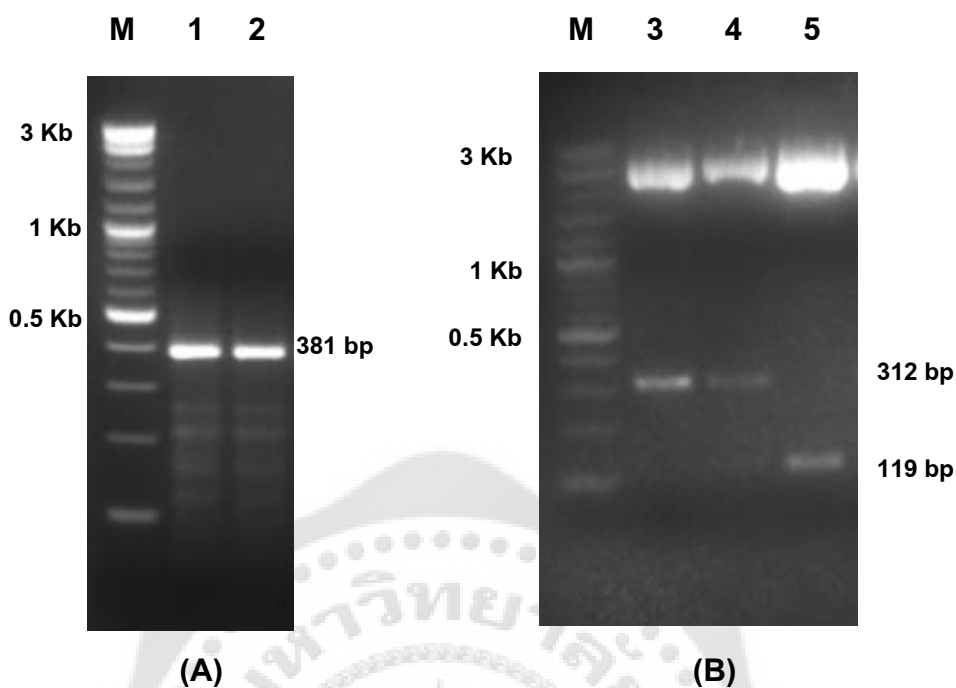
ภาพประกอบ 24 ผลผลิต PCR ขนาด 237 bp แสดงการติดเชื้อ *A. caviae* ในกุ้งที่เวลาต่างๆ หลังจากฉีดด้วย *A. caviae*
(+) คือ positive control ที่ใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *A. caviae* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

1.7 การผลิตอาร์เอ็นเอสายคู่

งานวิจัยนี้ได้ผลิตอาร์เอ็นเอสายคู่ด้วยวิธี *In vitro* transcription โดยบริเวณ TIR domain ของยีน *MrToll* เป็นบริเวณที่นำมาสร้างสายอาร์เอ็นเอเนื่องจาก TIR domain ทำหน้าที่ส่งสัญญาณต่างๆ (downstream signal transduction) เข้าสู่ภายในเซลล์ หลังจากที่ถูก LRR จับกับ PAMP โดยหากบริเวณนี้ถูก knock down จะส่งผลให้ไม่เกิดการส่งสัญญาณเป็นลำดับขั้นไปกระตุ้นการตอบสนองต่อเชื้อโรค

1.7.1 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดสำหรับ TIR domain ของยีน *MrToll*

ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี RT-PCR ซึ่งผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นมีขนาด 381 bp (ภาพประกอบ 25 A) จากนั้นทำการโคลนผลผลิต PCR เข้าสู่พลาสมิด pGEM-T Easy Vector (Promega) โดยโคลนเข้าสู่พลาสมิดสองทิศทางคือ สาย sense และ antisense เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบที่นำมาทำปฏิกิริยา *In vitro* transcription จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดไปตรวจสอบการมีอยู่ของ insert โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I ซึ่งอยู่บริเวณ multiple cloning site ของพลาสมิดหนึ่งตำแหน่งและอยู่บริเวณ TIR domain อีกหนึ่งตำแหน่ง โดยรีคอมบิแนนท์พลาสมิดสาย sense เมื่อถูกตัดด้วย *Pst*I จะได้ดีเอ็นเอ 2 ขนาดคือ ขนาดประมาณ 3,018 bp และขนาด 119 bp ขณะที่รีคอมบิแนนท์พลาสมิดสาย antisense มีขนาดประมาณ 3,018 bp และขนาด 312 bp (ภาพประกอบ 25)



ภาพประกอบ 25 การสังเคราะห์ผลผลิต PCR และการวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์พลาสมิดสาย sense และ สาย antisense เพื่อนำไปผลิตอาร์เอ็นเอสายคู่

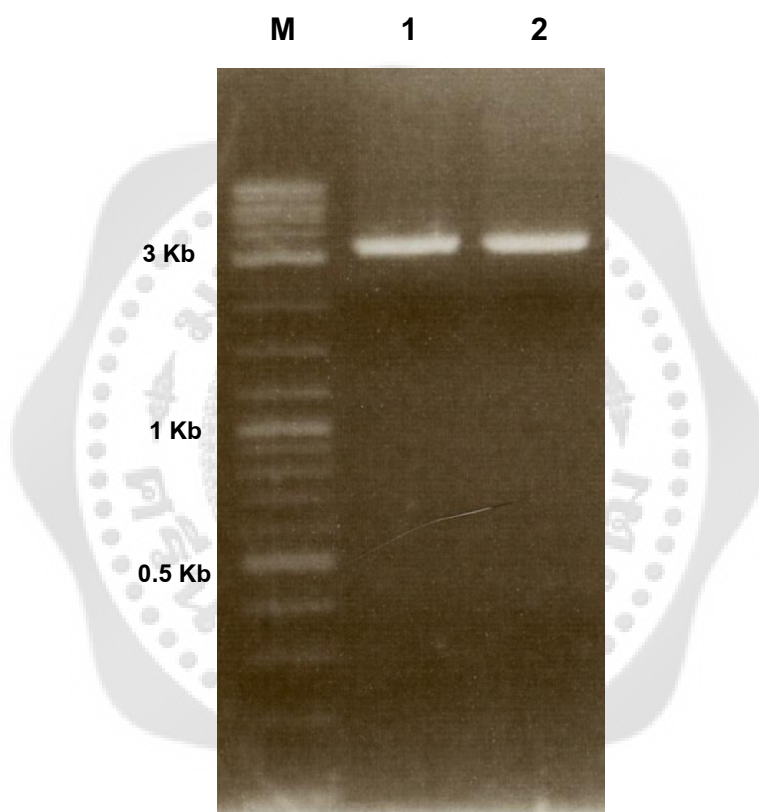
(A) คอลัมน์ที่ 1 และ 2 ผลผลิต PCR ของ MrToll ขนาด 381 bp

(B) คอลัมน์ที่ 3 และ 4 การวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy Vector สาย antisense โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I โดยพลาสมิด pGEM-T Easy Vector มีขนาดประมาณ 3 kb ส่วน MrToll ขนาด 312 bp คอลัมน์ที่ 5 การวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy Vector สาย sense โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I โดยพลาสมิด pGEM-T Easy Vector มีขนาดประมาณ 3 kb ส่วน MrToll ขนาด 119 bp

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (2-log DNA ladder)

1.7.2 การเตรียมดีเอ็นเอเส้นตรง (linearized DNA) สาย sense หรือ antisense

จากการสกัดพลาสมิดด้วยชุด Geneaid Plasmid Midi kit ตามคู่มือของ Geneaid พบว่าสามารถสกัดพลาสมิดในปริมาณสูงโดยรีคอมบิแนนท์พลาสมิดสาย sense มีปริมาณพลาสมิด 60 ไมโครกรัม ขณะที่รีคอมบิแนนท์พลาสมิดสาย antisense มีปริมาณพลาสมิด 67 ไมโครกรัม จากนั้นนำคอมบิแนนท์พลาสมิดทั้งสาย sense และ antisense มาตัดด้วยเอนไซม์ *SacI* restriction enzyme เพื่อเปิดวงพลาสมิดให้เป็นดีเอ็นเอเส้นตรง (linearized DNA Template) สำหรับใช้เป็นต้นแบบในปฏิกิริยา *In vitro* transcription (ภาพประกอบ 26)



ภาพประกอบ 26 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดสาย sense และ antisense สำหรับใช้เป็นต้นแบบในปฏิกิริยา *In vitro* transcription

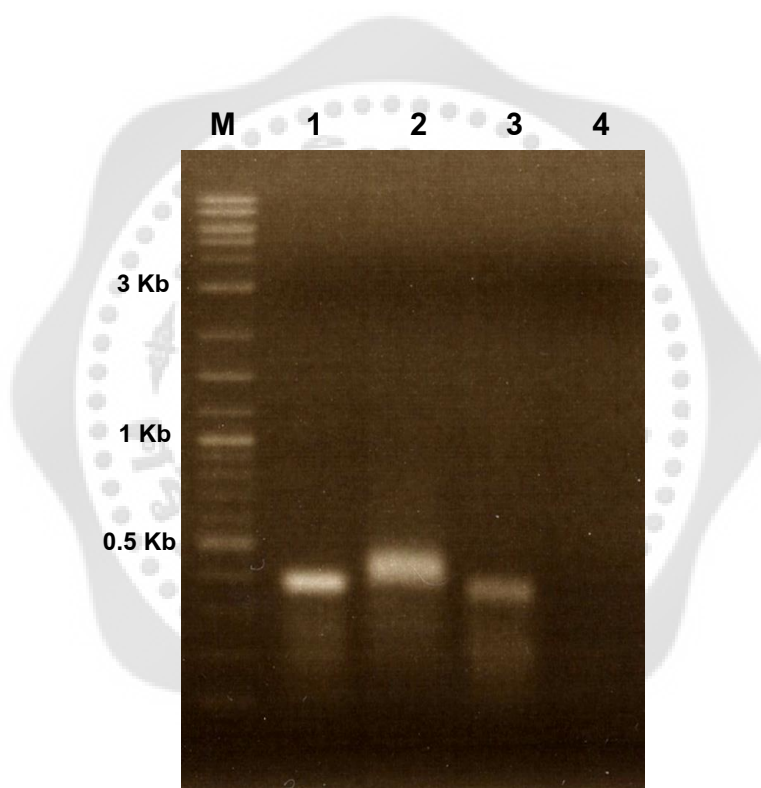
คอลัมน์ 1 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดสาย sense ตัดด้วยเอนไซม์ *SacI* restriction enzyme

คอลัมน์ 2 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดสาย antisense ตัดด้วยเอนไซม์ *SacI* restriction enzyme

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (2-log DNA ladder)

1.7.3 การตรวจสอบความเป็นอาร์เอ็นเอสายคู่

จากการสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ (dsRNA) จากดีเอ็นเอสาย sense และ antisense และทำให้บริสุทธิ์แล้ว ทำการทดสอบอาร์เอ็นเอที่สร้างขึ้นในการจับกันเป็นสายคู่ โดยนำ dsRNA ที่สังเคราะห์ขึ้นส่วนหนึ่งมาทดสอบการย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ DNase I (Fermentas) การย่อยอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (ssRNA) ด้วย เอนไซม์ RNaseA (Fermentas) และการย่อยอาร์เอ็นเอสายคู่ (dsRNA) ด้วยเอนไซม์ ShortCut RNase III (New England Biolabs) พบว่าเอนไซม์ DNase I และ เอนไซม์ RNaseA ไม่สามารถย่อย dsRNA ที่สังเคราะห์ขึ้นจึงปรากฏแบน แต่เอนไซม์ ShortCut RNase III สามารถย่อย dsRNA ที่สังเคราะห์ได้จึงไม่ปรากฏแบนให้เห็น (ภาพประกอบ 27)



ภาพประกอบ 27 การตรวจสอบความเป็นอาร์เอ็นเอสายคู่

คอลัมน์ 1 dsRNA-Toll ที่สังเคราะห์ขึ้น

คอลัมน์ 2 การย่อย dsRNA-Toll ที่สังเคราะห์ขึ้นด้วย DNase I

คอลัมน์ 3 การย่อย dsRNA-Toll ที่สังเคราะห์ขึ้นด้วย RNaseA

คอลัมน์ 4 การย่อย dsRNA-Toll ที่สังเคราะห์ขึ้นด้วย ShortCut RNase III

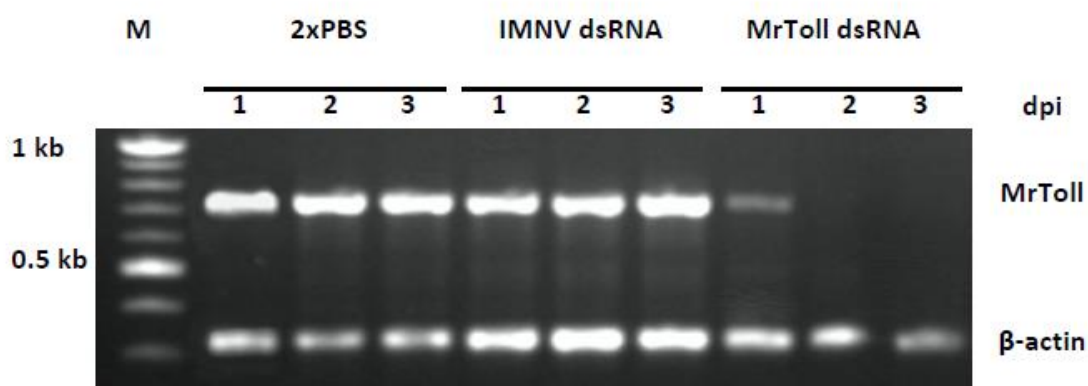
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (2-log DNA ladder)

1.8 การศึกษาผลการยับยั้งการแสดงออกของยีน *MrToll* ในกิ้งก่ามกรามโดยวิธี dsRNA-mediated RNA interference

1.8.1 การศึกษาจำนวนวันที่เหมาะสมในการ knock-down ยีน *MrToll*

จากการทดลองฉีดกิ้งก่ามกรามด้วย dsRNA-Toll ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว กิ้ง (กรัม) ในกิ้งกลุ่มทดลอง ฉีด dsRNA-IMNV ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว กิ้ง (กรัม) ในกิ้งกลุ่มควบคุม และฉีด 2XPBS ที่ปราศจากเชื้อในกิ้งกลุ่มควบคุม จากนั้นเก็บตัวอย่าง muscle กิ้งกลุ่มละ 3 ตัวทุกวันตั้งแต่วันเริ่มต้น (วันที่ 0) ถึงวันที่ 7 นำมาสกัดอาร์เอ็นเอ และทำ RT-PCR เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *MrToll* โดยยีน β -actin เป็น internal control ผลการทดลองพบว่า dsRNA-Toll สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *MrToll* โดยสามารถยับยั้งการแสดงออกอย่างสมบูรณ์ในวันที่ 2 หลังจากฉีดด้วย dsRNA-Toll (ภาพประกอบ 28)

สำหรับกิ้งกลุ่มควบคุมที่ฉีด dsRNA-IMNV หรือ 2XPBS ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *MrToll* นอกจากนี้การฉีดด้วย dsRNA-Toll และ dsRNA-IMNV ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน β -actin เช่นกัน (ภาพประกอบ 28)



ภาพประกอบ 28 การแสดงออกของยีน *MrToll* ใน muscle ของกิ้งก่ามกรามที่เวลาต่างๆ หลังจากถูก knock-down ด้วยวิธี dsRNA-mediated RNA interference โดยตัวเลขเหนือภาพแสดงจำนวนวันหลังจากฉีดด้วย dsRNA-Toll, dsRNA-IMNV และ 2XPBS (dpi) ผลการทดลองพบว่า dsRNA-Toll สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *MrToll* อย่างสมบูรณ์ในวันที่ 2 หลังจากฉีดด้วย dsRNA-Toll M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (2-log DNA ladder)

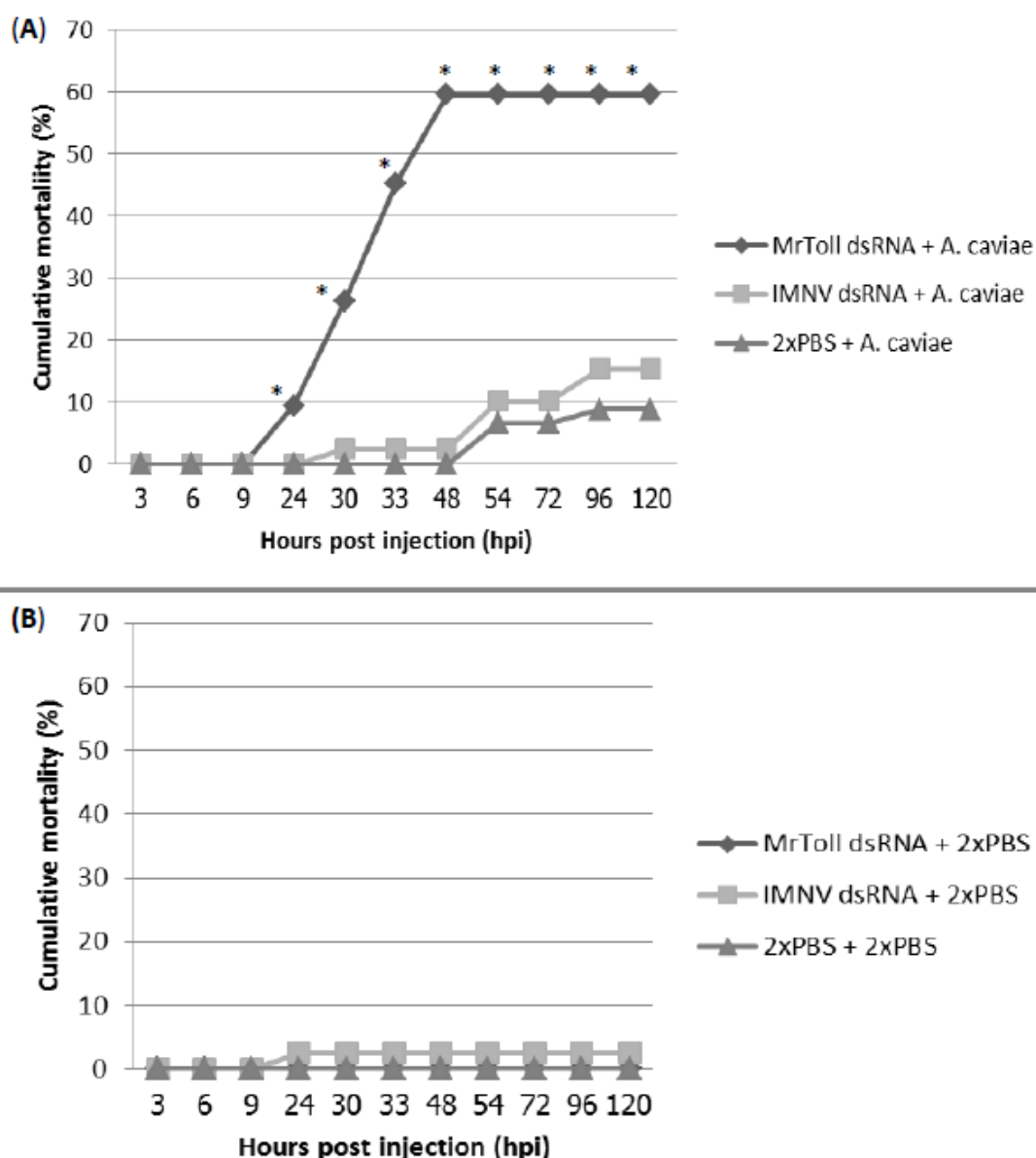
1.8.2 การศึกษาผลของเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* ในกุ้งที่ถูก knock-down ยีน *MrToll*

การทดสอบความสามารถของยีน *MrToll* ในการตอบสนองต่อแบคทีเรีย ทำโดยการยับยั้งการแสดงออกของยีน *MrToll* โดยหลังจากฉีด dsRNA-Toll, dsRNA-IMNV และ 2XPBS 2 วัน ซึ่งเป็นวันที่ยีน *MrToll* ถูกยับยั้งการแสดงออกอย่างสมบูรณ์ ทำการฉีดเชื้อ *A. caviae* ความเข้มข้น 10^6 CFU ต่อน้ำหนักตัวกุ้ง (กรัม) และฉีด 2XPBS ที่ปราศจากเชื้อ ในกุ้งแต่ละกลุ่ม จากนั้นนับอัตราการตายของกุ้งที่เวลาต่างๆ รวมทั้งเก็บตัวอย่างเลือดและ muscle กุ้งกลุ่มละ 3 ตัว พบว่า กุ้งกลุ่มที่ถูกฉีดเชื้อ *A. caviae* หลังจากฉีดด้วย dsRNA-Toll, dsRNA-IMNV และ 2XPBS 2 วัน พบอัตราการตายในกลุ่มที่ถูก knock-down ด้วย dsRNA-Toll เพิ่มขึ้นภายในชั่วโมงที่ 24 หลังจากกุ้งถูกฉีดด้วยแบคทีเรียจากนั้นเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 30 ถึงชั่วโมงที่ 48 โดยตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 พบว่าอัตราการตายในกลุ่มที่ถูก knock-down ด้วย dsRNA-Toll เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกุ้งกลุ่มที่ถูกฉีดด้วย dsRNA-IMNV (Tukey's-b, $P < 0.05$) โดยกุ้งกลุ่มที่ฉีด dsRNA-Toll, dsRNA-IMNV และ 2XPBS หลังจากถูกฉีดด้วย *A. caviae* พบว่ากุ้งมีอัตราการตายร้อยละ 59.52, 15.38 และ 8.8 ตามลำดับ (ภาพประกอบ 29 A)

สำหรับกุ้งกลุ่มที่ถูกฉีด 2XPBS หลังจากฉีดด้วย dsRNA-Toll, dsRNA-IMNV และ 2XPBS 2 วัน มีอัตราการตายต่ำกว่าทุกกลุ่ม โดยกลุ่มที่ถูก knock-down ด้วย dsRNA-Toll และกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย 2XPBS กุ้งมีชีวิตรอดปกติไม่พบการตาย ส่วนกุ้งกลุ่มที่ฉีด dsRNA-IMNV พบอัตราการตายเพียงร้อยละ 2.56 ซึ่งอัตราการตายของกุ้งทั้ง 3 กลุ่มไม่แตกต่างกัน (Tukey's-b, $P > 0.05$) อย่างไรก็ตามในกุ้งกลุ่มที่ถูก knock-down ด้วย dsRNA-Toll แต่ไม่ได้ถูกฉีดด้วยแบคทีเรีย แม้ว่าการแสดงออกของยีน *MrToll* จะลดลง แต่ก็ไม่มีผลต่อความอยู่รอดของกุ้ง (ภาพประกอบ 29 B)

เมื่อทำการเก็บเลือดกุ้งกลุ่มต่างๆ หลังจากฉีดด้วย *A. caviae* ที่เวลา 9, 24, 48, 72 และ 120 ชั่วโมง มานับจำนวนแบคทีเรียที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ด้วยวิธี plate count พบว่า กุ้งกลุ่มที่ถูก knock-down ด้วย dsRNA-Toll มีจำนวนแบคทีเรียในเลือดเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในชั่วโมงที่ 9, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ถูกฉีดด้วย dsRNA-IMNV และ 2XPBS (ภาพประกอบ 30) และเมื่อสุมแบคทีเรียบนอาหาร TSA มาทำ Colony PCR พบว่า โคลนีที่เกิดขึ้นเป็นเชื้อ *A. caviae* เนื่องจากให้ผลผลิต PCR ขนาด 237 bp ตามวิธีของ Payattikul (Payattikul; et al. 2015: 164-171)

ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าจากการ knock-down ยีน *MrToll* ส่งผลให้อัตราการตายของกุ้งกลุ่มที่ถูกฉีดด้วย *A. caviae* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นโปรตีน MrToll จึงมีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง



ภาพประกอบ 29 กราฟแสดงอัตราการตายของกุ้งก้ามกรามหลังจากถูกฉีดด้วย dsRNA-Toll,

dsRNA-IMNV และ 2XPBS จากนั้นแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม

(A) กราฟแสดงอัตราการตายของกุ้งกลุ่มที่ถูกฉีดด้วย *A. caviae* (กลุ่มทดลอง)

(B) กราฟแสดงอัตราการตายของกุ้งกลุ่มที่ถูกฉีดด้วย 2XPBS (กลุ่มควบคุม)

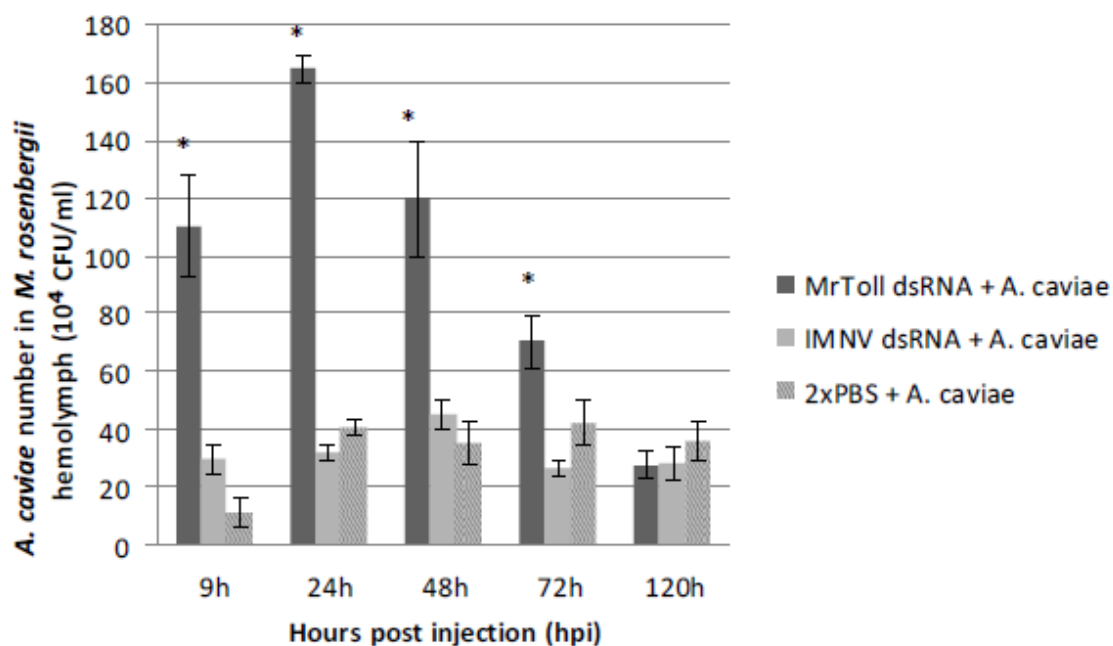
วิเคราะห์ข้อมูลอัตราการตายที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ถูกฉีดด้วย

dsRNA-Toll, dsRNA-IMNV และ 2XPBS โดยวิธี Tukey's-b ที่ค่า $p < 0.05$ จากกราฟแสดง

ให้เห็นว่ากุ้งกลุ่มทดลอง ($n = 15$) ที่เวลา 0, 3, 6, 9, 24, 30, 33, 48, 54, 72, 96 และ 120 ชั่วโมงหลังจากฉีดเชื้อ *A. caviae* พบอัตราการตายสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

* คือ อัตราการตายของกุ้งที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งพบในกลุ่มที่ถูกฉีดด้วย

A. caviae ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป ($P < 0.05$)



ภาพประกอบ 30 กราฟแสดงจำนวนแบคทีเรียในน้ำเลือดกุ้งก้ามกรามหลังจากกุ้งถูกฉีดด้วย dsRNA-Toll, dsRNA-IMNV และ 2XPBS จากนั้นฉีดเชื้อ *A. caviae* และทำการเก็บตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งที่เวลาต่างๆ มานับจำนวนแบคทีเรีย โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ พบว่ากุ้งกลุ่มที่ถูก Knock-down ด้วย dsRNA-Toll หลังจากถูกฉีดด้วย *A. caviae* จะมีจำนวนแบคทีเรีย *Aeromonas* spp (CFU/มิลลิลิตร) สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยเส้นเหนือกราฟแสดงค่า mean $\pm$ SD

* คือจำนวนแบคทีเรียในน้ำเลือดของกุ้งกลุ่มที่ถูก knock-down ด้วย dsRNA-Toll มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ถูกฉีดด้วย dsRNA-IMNV และ 2XPBS ($P < 0.05$)

2. การแยกยีนและศึกษาคุณสมบัติของ MrHC

2.1 การโคลนและการหาลำดับ cDNA บางส่วนของยีน MrHC

2.1.1 การออกแบบ degenerate primer

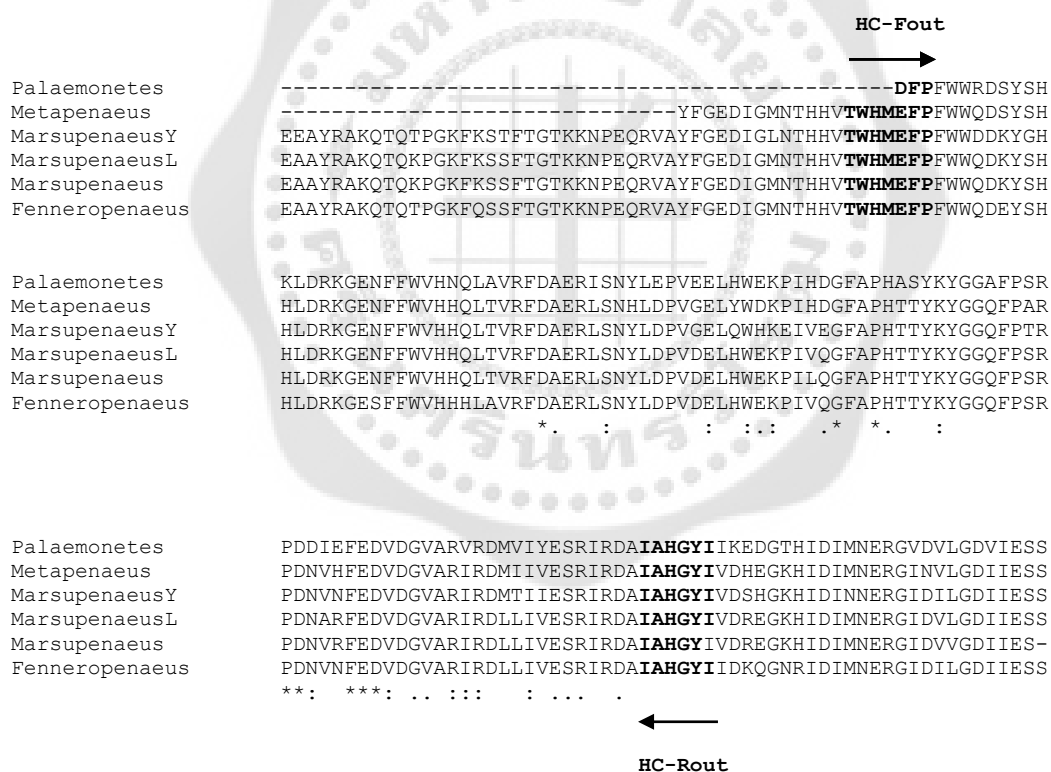
สำหรับการออกแบบ degenerate primer ของยีน MrHC โดยการเปรียบเทียบบริเวณ conserved regions ของ hemocyanin จากกุ้งชนิดต่างๆ ดังนี้ *F. paulensis* (AAV48599.1) *P. monodon* (AAL27460.1) *M. japonicus* (ABR14693.1, AAS92971.1, ABR14694.1) *F. chinensis* (ACM61982.1) *P. pugio* (AAX38504.1) และ *M. ensis* (ABV58636.1) แสดงในภาพประกอบ 31

degenerate primer สำหรับหาลำดับดีเอ็นเอของยีน MrHC มีลำดับเบสดังนี้

HC-Fout : 5'-ACNTGGCAYATGGARTTYCC-3'

HC-Rout : 5'-TANCCRTGGGCAATAGCATC-3'

(N= A, C, G, T; Y= C, T; R = A, G)

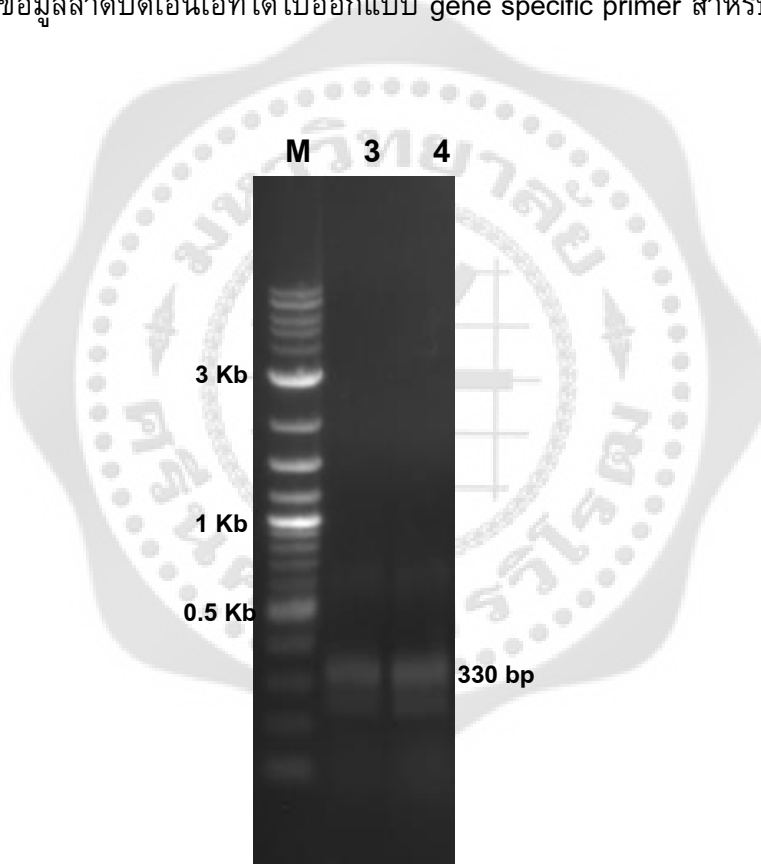


ภาพประกอบ 31 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ hemocyanin ในกุ้ง

M. japonicus (AAS92971.1) *M. japonicus* subunit L (ABR14693.1) *M. japonicus* subunit Y (ABR14694.1) *F. chinensis* (ACM61982.1) *P. pugio* (AAX38504.1) และ *M. ensis* (ABV58636.1) ด้วยโปรแกรม ClustalW โดยเครื่องหมายลูกศรแสดงตำแหน่งและทิศทางของลำดับกรดอะมิโนที่นำไปใช้ออกแบบ degenerate primers ที่ใช้ในการทดลอง โดยชื่อของ primer กำกับอยู่บนลูกศร

2.1.2 การโคลนและการหาลำดับ cDNA บางส่วนของยีน *MrHC*

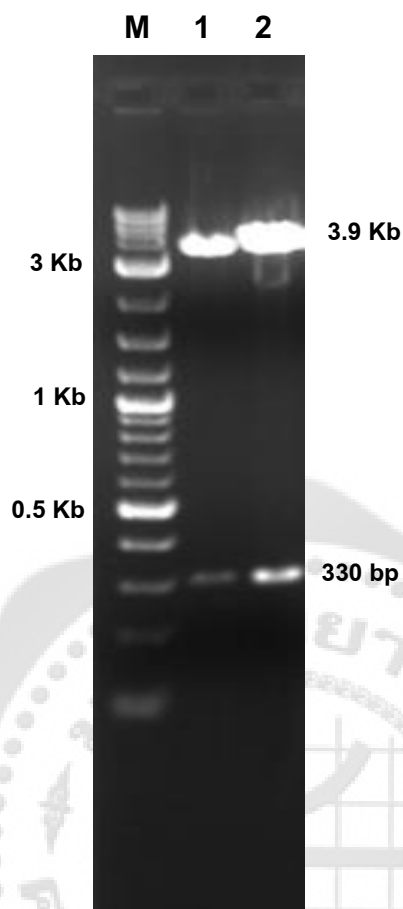
จากการนำอาร์เอ็นเอที่สกัดจาก hepatopancreas ของกุ้งก้ามกรามมาสังเคราะห์ cDNA เพื่อใช้เป็นต้นแบบสำหรับหาลำดับดีเอ็นเอของยีน *MrHC* พบว่าผลผลิต PCR ของ *MrHC* มีความยาว 330 bp (ภาพประกอบ 32) จึงโคลนผลผลิต PCR นี้ เข้าสู่พลาสมิด pCR 2.1 vector จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดไปตรวจสอบการมีอยู่ของ insert โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*-HF™ โดยชิ้นหนึ่งมีประมาณ 3.9 kb ของพลาสมิด pCR 2.1 vector และอีกชิ้นหนึ่งมีความยาวประมาณ 330 bp ของ *MrHC* (ภาพประกอบ 32) จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดไปหาลำดับดีเอ็นเอ ตรวจสอบความถูกต้องของ ORF และการแปลรหัสเป็นโปรตีน พบว่า ลำดับดีเอ็นเอของ insert *MrHC* ความคล้ายสูงกับบริเวณโดเมนที่ 2 ในสายโพลีเปปไทด์ของ hemocyanin ของกุ้งชนิดต่างๆ นำข้อมูลลำดับดีเอ็นเอที่ได้ไปออกแบบ gene specific primer สำหรับหาลำดับดีเอ็นเอที่ครบสมบูรณ์



ภาพประกอบ 32 ผลผลิต PCR ของ *MrHC*

คอลัมน์ที่ 1 และ 2 ผลผลิต PCR ของ *MrHC* ขนาด 330 bp

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (2-log DNA ladder)



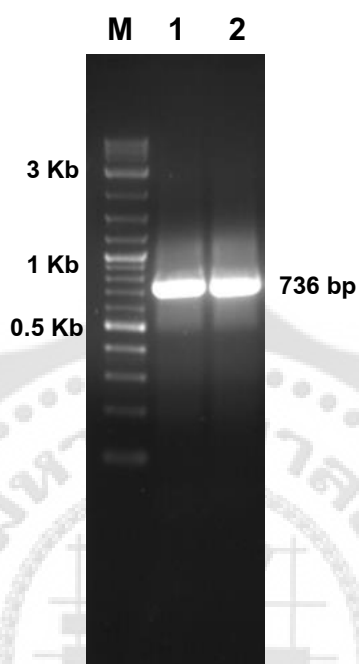
ภาพประกอบ 33 การวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCR 2.1-MrHC

โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*-HFTM โดยคอลัมน์ที่ 1 และ 2 พลาสมิด pCR 2.1 มีขนาดประมาณ 3.9 kb ส่วน *MrHC* มีขนาด 330 bp ส่วน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (2-log DNA ladder)

2.2 การหาข้อมูลลำดับ cDNA ทางปลาย 5' และปลาย 3' โดยวิธี RACE ของยีน *MrHC*

จากการนำอาร์เอ็นเอจาก hepatopancreas ของกิ้งก่ามกรามาเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA เส้นแรกทางปลาย 5' (5' cDNA ends RACE) และปลาย 3' (3' cDNA ends RACE) พบว่าผลการสังเคราะห์ 5'-RACE ของ *MrHC* มีความยาว 736 bp (ภาพประกอบ 34) ขณะที่ 3'-RACE มีความยาว 1,539 bp (ภาพประกอบ 35) จากนั้นโคลนผลผลิต 5'-RACE และ 3'-RACE ของ *MrHC* เข้าสู่พลาสมิด pCR 2.1 vector นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดไปตรวจสอบการมีอยู่ของ insert โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*-HFTM โดยชิ้นหนึ่งมีความยาวประมาณ 3.9 kb ของพลาสมิด pCR 2.1 vector และอีกชิ้นหนึ่งความยาวเท่ากับผลผลิต PCR ที่ถูกโคลน จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดไปหาลำดับดีเอ็นเอและหาบริเวณที่ overlap กันเพื่อรวมข้อมูลเป็นลำดับ

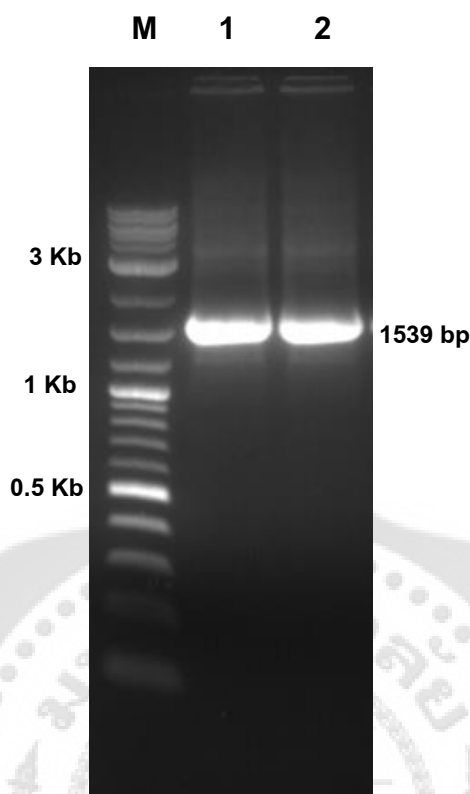
ดีเอ็นเอของ *MrHC* ที่สมบูรณ์ จากนั้นตรวจสอบความถูกต้องของ ORF และการแปลรหัสเป็นโปรตีน พบว่าลำดับดีเอ็นเอของ *MrHC* มีความยาว 2,244 bp โดยมีความคล้ายสูงกับ hemocyanin ของกุ้งชนิดต่างๆ



ภาพประกอบ 34 ผลการสังเคราะห์ 5'-RACE ของ *MrHC*

คอลัมน์ที่ 1 และ 2 คือ ผลการสังเคราะห์ 5'-RACE ของ *MrHC* มีความยาว 736 bp

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (2-log DNA ladder)



ภาพประกอบ 35 ผลการสังเคราะห์ 3'-RACE ของ *MrHC*
 คอลัมน์ที่ 1 และ 2 คือ ผลการสังเคราะห์ 3'-RACE ของ *MrHC* มีความยาว 1,539 bp
 M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (2-log DNA ladder)

2.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีน *MrHC*

เมื่อนำข้อมูลลำดับดีเอ็นเอและกรดอะมิโนของ *MrHC* ที่สมบูรณ์จากการแปลรหัสยีนทั้งสองแล้วมาวิเคราะห์บริเวณ signal peptide, วิเคราะห์บริเวณ extracellular domain, transmembrane domain, cytoplasmic domains, วิเคราะห์ตำแหน่ง Potential N-linked glycosylation sites, regulatory motifs ของ putative promoter region และองค์ประกอบต่างๆ ให้ผลดังนี้

cDNA ของ *MrHC* มีความยาว 2,244 นิวคลีโอไทด์ โดย 5' untranslated region (5'-UTR) และ 3' untranslated region (3'-UTR) มีความยาว 66 นิวคลีโอไทด์ และ 186 นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ และพบ putative polyadenylation signal sequence มีลำดับ AATAAA ที่บริเวณ 3'-UTR เนื่องจาก poly-A tail 13 นิวคลีโอไทด์ นอกจากนี้พบว่า ATG start codon ที่ตำแหน่ง +1 มีลำดับเบสดังนี้ ACAATGC ซึ่งตรงกับบริเวณ Kozac consensus sequence (A/GCCAUGG) ของ initiation codon ใน eukaryotic translation sites อยู่ 5 ใน 7 ตำแหน่ง โดย *MrHC* มี ORF ยาว

1,992 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นสายโพลีเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 663 หน่วย พบตำแหน่ง Potential N-linked glycosylation sites ที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 509 (NGSW) (ภาพประกอบ 36)

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีน แสดงให้เห็นว่าโปรตีน MrHC แบ่งออกเป็น 3 โดเมน คือ hemocyanin-all-alpha domain ประกอบด้วยกรดอะมิโน 124 หน่วย (ตำแหน่งที่ 21-144), hemocyanin-copper containing domain ประกอบด้วยกรดอะมิโน 258 หน่วย (ตำแหน่งที่ 148-405) และ hemocyanin-immunoglobulin-like domain ประกอบด้วยกรดอะมิโน 248 หน่วย (ตำแหน่งที่ 411-658) โดยโปรตีน MrHC มีมวลโมเลกุล 76.5 kDa (ภาพประกอบ 36)

จากการวิเคราะห์ ORF ของ MrHC พบว่าร้อยละ 99 มีความเหมือน (identity) กับ hemocyanin 2 ของ *Pacifastacus leniusculus* (accession no. AAO47336.1) hemocyanin ของ *F. chinensis* (accession no. ACM61982.1) hemocyanin ของ *L. vannamei* (accession no. CAA57880.1) และ hemocyanin subunit Y ของ *M. japonicas* (accession no. ABR14964.1) ร้อยละ 97 มีความเหมือนกับ hemocyanin subunit L ของ *M. japonicas* (accession no. ABR14693.1) ร้อยละ 96 มีความเหมือนกับ hemocyanin alpha-subunit ของ *Homarus americanus* (accession no. CAB75960.1)



-66 CGATTCTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGGGACGTCACA
 1 ATGCAGGTGCTTGTCTTGTGCGCTCTGGTAGCATTTGCTGCCGCCGATGTACCATTGGCCAAGAGA
 1 M Q V L V L C A L V A F A A A D V P L A K R
 67 CAGCAGGATGTCAATCACCTGTTGTGGAATGTCTATGACCACCACCACTTTGATGACCTGAAAGGA
 23 Q Q D V N H L L W N V Y D H H H F D D L K G
 133 TATGCAGCATCTTTTGACCCTGTAGGAGATGTGTACAAATATAAGGATGGAGGAGAAGCTGCAAGG
 45 Y A A S F D P V G D V S Q Y K D G G E A A R
 199 CTACACGTCCAGGAAGAGAAAGATCACAGACTCCTTGATCAGCATCACTGGTTCTCACTCTTCAAT
 67 H L V Q E E K D H R L L D Q H H W F S L F N
 265 GAACGCCAAAGAGAGAGGAGCTCTTATGCTCTTTGAAGTCTTAATACAATGCAAGGAGTGGGACTGT
 89 E R Q R E E A L M L F E V L I Q C K E W D C
 331 GCTGTTAAAAATGCTGCATACTGGCGTGAACATATGAATGAAGGAGAGTTTGTGTATGCCCTTTAC
 111 A V K N A A Y W R E H M N E G E F V Y A L Y
 397 ACTGCTGTCACTTCACTCTGATCTTGGACATGGCATTGTTCTCCCCCACTCTATGAAGTTACCCCT
 133 T A V I H S D L G H G I V L P P L Y E V T P
 463 CATTTGTTTCAAAACAGTGAAATTATCCAAAAAGCTTACACTGCAAAGATGACCAACACCCCAGGC
 155 H L F T N S E I I Q K A Y T A K M T N T P G
 529 AAATTTGAGATGGAATTCACAGGTACAAAGAAAAATAAGGAACAACGTGTGGCCTACTTTGGAGAA
 177 K F E M E F T G T K K N K E Q R V A Y F G E
 595 GATATTGGAATGAACGTCCATCACGTACCTGGCATATGGATTTCCTTCTGGTGGGAAGACAGA
 199 D I G M N V H H V T W H M D F P F W W E D R
 661 TATGGTGGTAACTTGGATCGCAAGGGAGAGCTTTTCTTCTGGGTTTCATCATCAGCTCACTGTTCCG
 221 Y G G N L D R K G E L F F W V H H Q L T V R
 727 TTTGATTCTGAGCGTCTTTCCAACTATTTGGATATGGTAGATGAACCTCAATGGGATAAACCAATA
 243 F D S E R L S N Y L D M V D E L Q W D K P I
 793 GAAGAAGGATTTGCCCCACACACTATCTACAAATATGGCGGTGAATTCCTGCCCCGCTGATCAT
 265 E E G F A P H T I Y K Y G G E F P A R P D H
 859 ATTCACTTTGAAGATGTTGATGGAGTAGCAAGAGTTTCGTGACATGATTATCATGGAAAGTCGCATT
 287 I H F E D V D G V A R V R D M I I M E S R I
 925 CATGATGCAATTGGCCGTGGATATATCACTGATAAGGATGGAAAGGTTATTAACATCATGAATGAC
 309 H D A I G R G Y I T D K D G K V I N I M N D
 991 CAAGGCATTGACAACTTGGTGACATCATTGAATCTTCTGTGTACAGTCCTAATGTTTCACTATTAT
 331 Q G I D K L G D I I E S S V Y S P N V Q Y Y
 1057 GGAGCTCTCCACAACCTTGGCTCACATTGCTTGGCCGTCAAGGAGACCCTCATGGAAAATACAAC
 353 G A L A H I M L G R Q G D P H G N
 1123 ATGCCTCCAGGTGTTATGGAACACTTTGAAACAGCCACTCGTGATCCTACATTCTTCCGTCTTCAC
 375 M P P G V M E H F E T A T R D P T F F R L H
 1189 AAATACATGGACAACATTTTCAAGGAACATAAATATAGTCTTCTCCATACACTCATGAAGACCTA
 397 K Y M D N I F K E H K Y S L P P Y T H E D L
 1255 GACTTCCCTGGTGTCAACGTTGATAGCCTTAGCATTGATGGAGAACTTAAACATATTTTGAGGAC
 419 D F P G V N V D S L S I D G E L K T Y F E D
 1321 TATGAATTTGACCTTCGTAATGCTGTAGATTCTGCTGAAGGCATTCCCACAGTTGATTTAAAGCC
 441 Y E F D L R N A V D S A E G I P T V D L K A
 1387 AGTGTTTCATCGTCTCAACCACGATGACTTCTCCTTTGTTGCTGACGTCAACAATAACAATGAAAA
 463 S V H R L N H D D F S F V A D V N N N N G K
 1453 GAAGTTGTTGGTACTTTCCGCATCTACCTTTGTCCCCGCTTTGACAACAACGGAGAGCGGTTTGAT
 485 E V V G T F R I Y L C P R F D N N G E R F D
 1519 TTCACTAATGGCAGCTGGCATGTATTGAAATGGACAAATTCTGGAAGACATTGTCTCCTGGAAGA
 507 F T N G S W H C I E M D K F W K T L S P G R
 1585 AATCATGTTGTAAGGAAATCAAGGGACTCTTCCGTCACTGTTCTCTGATGTGCCAGCTTCCAGTCT
 529 N H V V R K S R D S S V T V P D V P S F Q S
 1651 CTCATCGATGCAGCTGACAGTGGTAGTTTTAGCATGCCTGAATTCGAAAGGTCTTGTGGAATTCCC
 551 L I D A A D S G S F S M P E F E R S C G I P
 1717 AACAGAATGCTTTTGCCTAAGGGTAAGAAGAACGGCATGGACTTTGCTCTCATTCTGGCAGTCACT
 573 N R M L L P K G K K N G M D F A L I L A V T

```

1783 GATGGAAGCTATGACCTAACTCACTCAGATGCTGAATCTGAGCATGGAGGTACTCATGCTCAATGT
595 D G S Y D L T H S D A E S E H G G T H A Q C
1849 GGAGCTCATGGAGAAACGTATCCAGACAAGCGCCCTATGGGATTCCCTATTGATCGTTATATTCCA
617 G A H G E T Y P D K R P M G F P I D R Y I P
1915 GACAGACGTGTCTATGATGAACTACCAACATGAAGTTTACTTATGTGAAAGTATACCATGATGAC
639 D R R V Y D E T T N M K F T Y V K V Y H D D
1981 AGCCGCCATTAAACATTTCAAAAACAGCATGATTTATTATTTTGTGACAACAATACAAAACATTCAGTT
661 S R H *
2047 ACAAAGATCATAATGCAAAACATTTTGTGTTAGGTCTTGAAACCTCAAAATTGATATTAGAAAGTGG
2113 ATAACATCAAGCATAATAAAGATCTTGCATGACAAAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

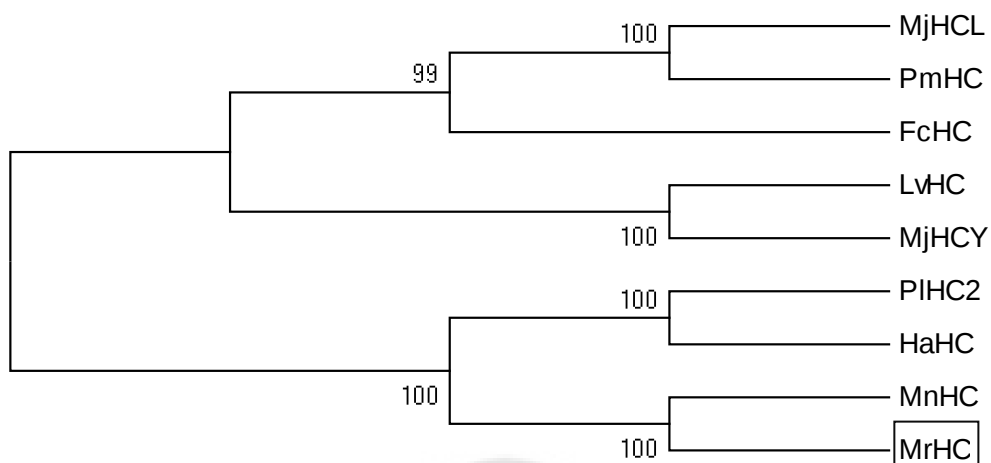
```

ภาพประกอบ 36 ภาพแสดงลำดับ cDNA และลำดับกรดอะมิโนของ MrHC

โดยตัวเลขด้านซ้ายแสดงตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน, รหัสอักษร (one-letter codes) ใต้ลำดับ cDNA แทนกรดอะมิโน, อักษรตัวหนา คือ initiation codon (ATG) และ stop codon (TAA) บริเวณที่ขีดเส้นใต้ คือ poly-A site กรอบสี่เหลี่ยมแสดงตำแหน่ง Potential N-linked glycosylation sites นิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนสีฟ้า คือ hemocyanin-all-alpha domain (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 21-144), นิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนสีแดง คือ hemocyanin-copper containing domain (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 148-405) และนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนสีเขียว คือ hemocyanin-immunoglobulin-like domain (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 411-658)

2.4 การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ MrHC

จากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ MrHC เปรียบเทียบกับกุ้งชนิดต่างๆ โดยใช้ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน hemocyanin จากกุ้งชนิดต่างๆ นำไปสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี neighbor joining และ Bootstrap 1,000 ครั้ง สามารถแบ่งกลุ่มของโปรตีน hemocyanin ที่นำมาศึกษาได้ 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย hemocyanin ของกุ้ง *F. chinensis* (FcHC; accession no. ACM61982.1) กุ้ง *L. vannamei* (LvHC; accession no. CAA57880.1) hemocyanin subunit Y ของ กุ้ง *M. japonicas* (MjHCY; accession no. ABR14964.1) hemocyanin subunit L ของกุ้ง *M. japonicas* (MjHCL; accession no. ABR14693.1) และ hemocyanin ของกุ้ง *P. monodon* (PmHC; accession no. AEB77775.1) กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย hemocyanin 2 ของกุ้ง *Pacifastacus leniusculus* (PIHC2; accession no. AAO47336.1) hemocyanin alpha-subunit α ของกุ้ง *Homarus americanus* (HaHC; accession no. CAB75960.1) hemocyanin ของ กุ้ง *Macrobrachium nipponense* (MnHc; accession no. AEC46861.1) โดยที่ MrHC จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน (ภาพประกอบ 37)

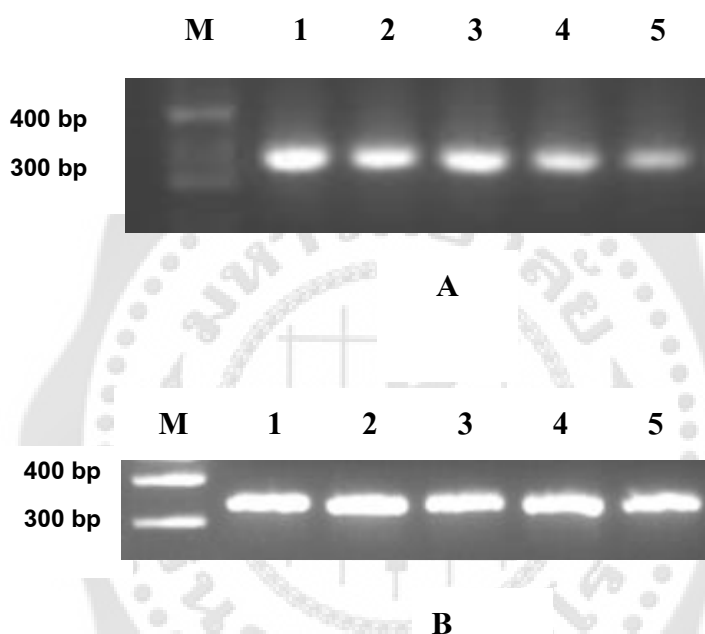


ภาพประกอบ 37 ภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ MrHC

จากการนำโปรตีน hemocyanin ในกุ้งชนิดต่างๆ มาสร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธี neighbor joining โดยใช้โปรแกรม MEGA 5.0 software และ Bootstrap 1,000 ครั้ง โปรตีน hemocyanin ของกุ้งที่นำมาศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการดังนี้ กุ้ง *Pacifastacus leniusculus* (PIHC2; accession no. AAO47336.1) กุ้ง *F. chinensis* (FcHC; accession no. ACM61982.1) กุ้ง *L. vannamei* (LvHC; accession no. CAA57880.1) กุ้ง *M. japonicas* (MjHCY; accession no. ABR14964.1) กุ้ง *M. japonicas* (MjHCL; accession no. ABR14693.1) กุ้ง *Homarus americanus* (HaHC; accession no. CAB75960.1) กุ้ง *P. monodon* (PmHC; accession no. AEB77775.1) กุ้ง *Macrobrachium nipponense* (MnHc; accession no. AEC46861.1)

2.5 การศึกษาการแสดงออกของยีน *MrHC* ในอวัยวะต่าง ๆ ของกุ้งก้ามกรามโดยวิธี semi-quantitative reverse transcriptase PCR

จากผลการทำ RT-PCR เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *MrHC* ในอวัยวะต่าง ๆ ของกุ้งก้ามกรามโดยใช้อาร์เอ็นเอที่สกัดจาก gill, hepatopancreas, hemocytes, stomach และ muscle พบว่า ยีน *MrHC* มีการแสดงออกในอวัยวะต่าง ๆ ในระดับที่ใกล้เคียงกัน โดยยีน *MrHC* มีการแสดงออกใน hepatopancreas สูงกว่าอวัยวะอื่นเล็กน้อย (ภาพประกอบ 38)



ภาพประกอบ 38 ผลผลิต PCR จากการทำ RT-PCR เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *MrHC*

คอลัมน์ที่ 1 ถึง 5 แสดงผลผลิต RT-PCR จาก hepatopancreas, hemocytes, gill, stomach และ muscle ตามลำดับ

(A) ผลผลิต RT-PCR ของยีน *MrHC* ขนาด 330 bp

(B) ผลผลิต RT-PCR ของยีน β -actin ขนาด 337 bp

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (2-log DNA ladder)

2.6 การศึกษาการแสดงออกของยีน *MrHC* ใน muscle ของกึ่งก้ามกรามหลังจากฉีดเชื้อ *MrNV* โดยวิธี quantitative real-time PCR (qPCR)

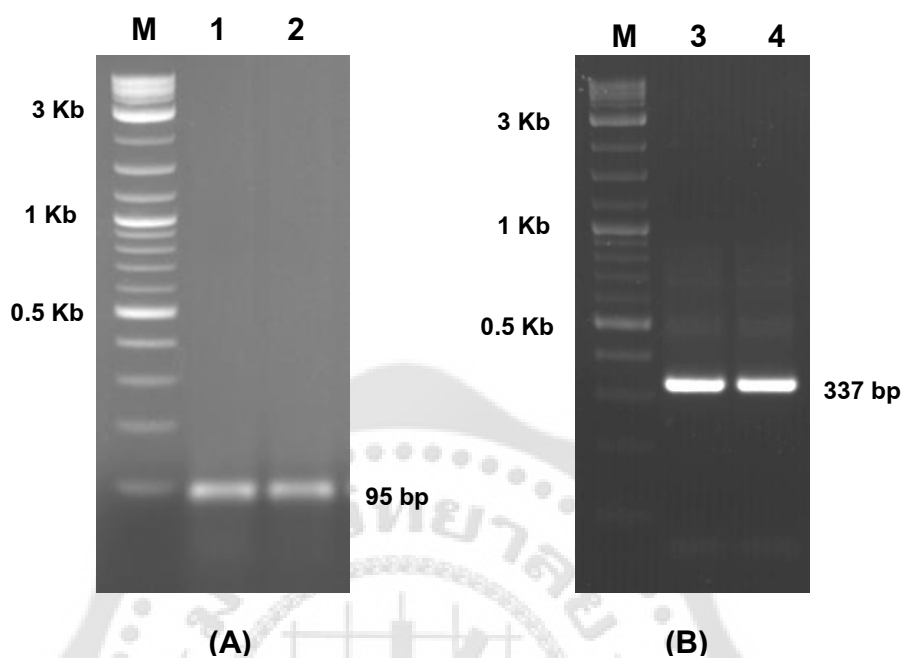
2.6.1 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเพื่อใช้สร้างกราฟมาตรฐาน

นำอาร์เอ็นเอจาก hepatopancreas ของกึ่งก้ามกรามเป็นอาร์เอ็นเอต้นแบบในการสร้างดีเอ็นเอด้วยวิธี RT-PCR ซึ่งผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นจากยีน *MrHC* และยีน β -actin มีขนาด 95 bp และ 337 bp ตามลำดับ (ภาพประกอบ 39) จากนั้นทำการโคลนผลผลิต PCR เข้าสู่พลาสมิด pGEM-T Easy Vector (Promega) เพื่อใช้คำนวณหาจำนวน copy number และนำมาสร้างกราฟมาตรฐานในการทำ qPCR ต่อไป

2.6.2 การทำ quantitative real-time PCR analysis

ทำการเก็บตัวอย่าง muscle ของกึ่งก้ามกรามกลุ่มทดลองที่ถูกฉีดเชื้อไวรัส *MrNV* และกลุ่มควบคุมที่ถูกฉีด 2XPBS ที่ปราศจากเชื้อ กลุ่มละ 3 ตัว หลังจากฉีดตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 7 นำมาสกัดอาร์เอ็นเอ จากนั้นสังเคราะห์ cDNA ส่วนของยีน *MrHC* และ β -actin นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T-*MrHC*-C และ pGEM-T- β -actin ที่มีจำนวน copy number 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 และ 1 ตามลำดับ cDNA ของ *MrHC* และ β -actin ที่สังเคราะห์ได้เป็นต้นแบบในการทำ qPCR โดยใช้เอนไซม์ ผลการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงปริมาณจากการทำ qPCR ด้วยวิธี $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Kenneth; & Thomas. 2001: 402–408) โดยใช้ยีน β -actin ในการนอร์มัลไลเซชัน (normalization) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ และนำค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean $\pm$ standard deviation) มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (One-way anova) ของการแสดงออกของยีน *MrHC* ในกลุ่มกึ่งก้ามกรามที่ฉีดเชื้อและกึ่งก้ามกรามที่ฉีด 2XPBS พบว่ากึ่งก้ามกรามในวันที่ 2 หลังจากถูกฉีดเชื้อ *MrNV* มีการแสดงออกของยีน *MrHC* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยพบการแสดงออกสูงถึง 237 เท่า เมื่อเทียบกับกึ่งก้ามกรามที่ฉีด 2XPBS (ภาพประกอบ 40)

นอกจากนี้ยังได้ทำการตรวจการติดเชื้อ *MrNV* ในกึ่งก้ามกรามเพื่อแสดงให้เห็นว่ากึ่งก้ามกรามกลุ่มทดลองติดเชื้อไวรัส โดยนำตัวอย่างอาร์เอ็นเอ muscle ของกึ่งก้ามกรามกลุ่มละ 3 ตัว ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 7 หลังจากฉีดเชื้อมาตรวจสอบการติดเชื้อโดยการทำ RT-PCR ตามวิธีการของ Wangman (Wangman; et al. 2012:121-131) พบว่ากึ่งก้ามกรามมีการติดเชื้อ *MrNV* โดยผลผลิต PCR ของ *MrNV* ที่ได้มีความยาว 1,041 bp (ภาพประกอบ 41)

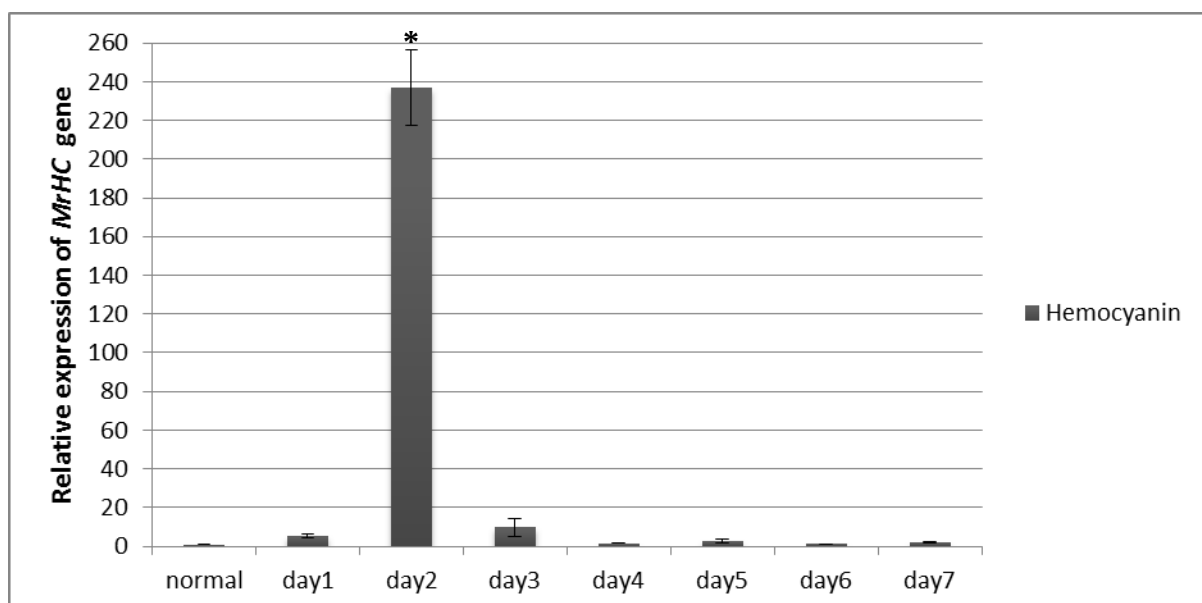


ภาพประกอบ 39 ผลผลิต PCR ของ *MrHC* และ β -actin

(A) คอลัมน์ที่ 1 และ 2 ผลผลิต PCR ของ *MrHC* ขนาด 95 bp

(B) คอลัมน์ที่ 3 และ 4 ผลผลิต PCR ของ β -actin ขนาด 337 bp

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (2-log DNA ladder)



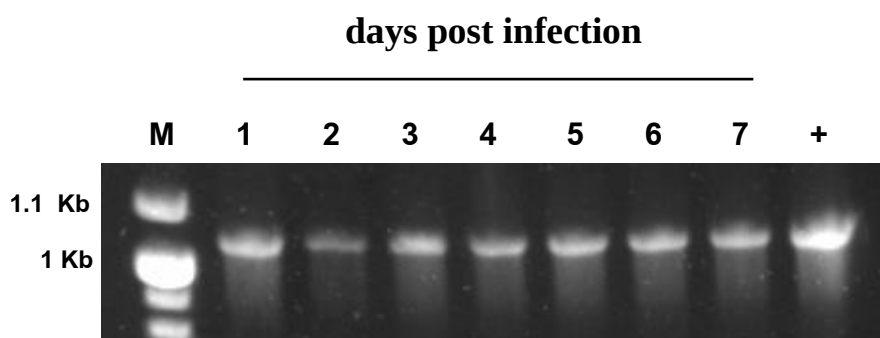
	normal	day1	day2	day3	day4	day5	day6	day7
<i>MrHC</i> gene	1	5.37	237.2	9.79	1.55	2.68	1.24	1.85

ภาพประกอบ 40 quantitative real-time PCR แสดงระดับการแสดงออกของยีน *MrHC* ของกุ้งที่ถูกฉีดเชื้อ *MrNV* และกุ้งปกติ ที่เวลาต่างๆ กัน

โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ และใช้ยีน β -actin ในการนอร์มัลไลเซชัน (normalization) พบว่ากุ้งก้ามกรามในวันที่ 2 หลังจากถูกฉีดเชื้อ *MrNV* มีการแสดงออกของยีน *MrHC* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

เส้นเหนือกราฟแสดงค่า mean + SD

* คือ การแสดงออกของยีน *MrHC* ของกุ้งที่ถูกฉีดเชื้อ *MrNV* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกุ้งปกติ ($P < 0.05$)



ภาพประกอบ 41 ผลผลิต PCR แสดงการติดเชื้อไวรัส *MrNV* ในกุ้งที่เวลาต่างๆ หลังจากฉีดด้วย *MrNV* โดยกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสพบผลผลิต PCR ขนาด 1,041 bp
(+) คือ positive control ที่ใช้อาร์เอ็นเอของเชื้อ *MrNV* เป็นต้นแบบ
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (2-log DNA ladder)

2.7 การศึกษาคุณสมบัติการต้านจุลชีพของโปรตีน MrHC ด้านปลาย C (MrHC-C)

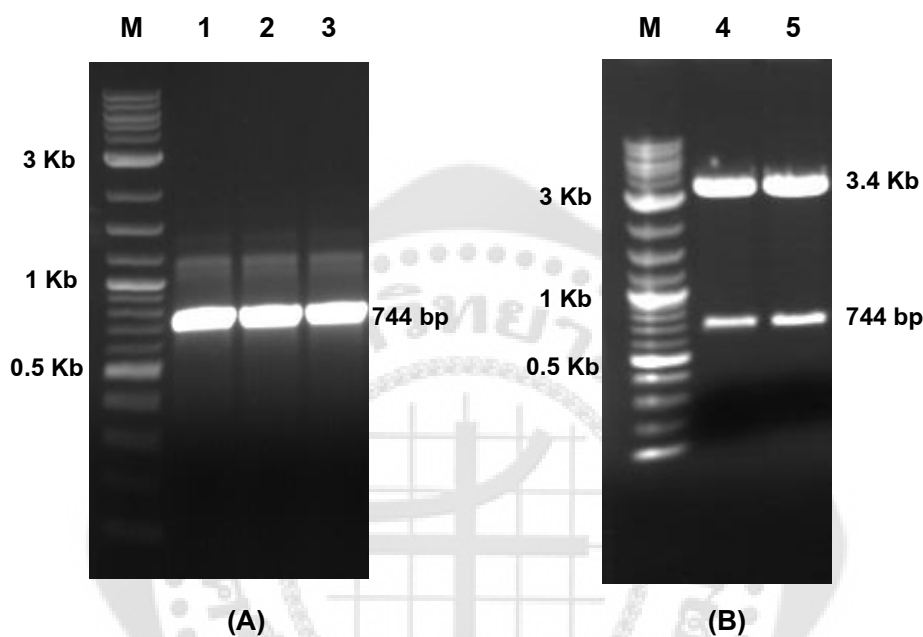
2.7.1 การผลิตโปรตีน MrHC-C

การศึกษาคุณสมบัติการต้านจุลชีพของโปรตีน MrHC ทางด้านปลาย C เริ่มจากการนำอาร์เอ็นเอจาก hepatopancreas ของกุ้งก้ามกรามมาทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนยีนทางด้านปลาย C พบว่าผลผลิต PCR ของ MrHC-C มีขนาด 744 bp (ภาพประกอบ 42) โดยปลายของผลผลิต PCR ทั้งสองมีการเติม *Bam*HI restriction site และ *Hind*III restriction site โคลนส่วนของ MrHC-C เข้าสู่ pQE-30 vector ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III แล้วนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดไปตรวจสอบการมีอยู่ของ insert โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3.4 kb ของพลาสมิด pQE-30 vector และชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 744 bp ของ MrHC-C (ภาพประกอบ 42)

จากการตรวจสอบลำดับเบสของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pQE-30-MrHC-C พบว่าพลาสมิดที่ได้มีการเชื่อมต่อในตำแหน่งที่ถูกต้องและลำดับดีเอ็นเอของ MrHC-C มีความเหมือนกับกรดอะมิโนทางด้านปลาย C ของโปรตีน MrHC โดยมี percent identity เท่ากับ 100 จากนั้นจึงนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pQE-30-MrHC-C ไป transform เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ M15 เพื่อกระตุ้นให้แบคทีเรียสร้างโปรตีน MrHC-C ต่อไป

เมื่อคัดเลือก *E. coli* สายพันธุ์ M15 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pQE-30-MrHC-C ได้แล้วนำมากระตุ้นให้แบคทีเรียสร้างโปรตีน MrHC-C จากนั้นเก็บเซลล์แบคทีเรียมาทำให้ผนังเซลล์แตกและวิเคราะห์โดยแยกบน SDS-PAGE พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน MrHC-C ซึ่งมีขนาดประมาณ 29 kDa (ภาพประกอบ 43 คอลัมน์ที่ 2) เมื่อเทียบกับ *E. coli* สายพันธุ์ M15 ที่ไม่มีพลาสมิด และ *E. coli* สายพันธุ์ M15 ที่มีพลาสมิด pQE-30 vector ซึ่งรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้จะมีโปรตีนฮิสทีตินเชื่อมอยู่ทางปลาย N

หลังจากคัดเลือก *E. coli* สายพันธุ์ M15 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pQE-30-MrHC-C และสามารถกระตุ้นให้แบคทีเรียสร้างโปรตีน MrHC-C ได้แล้ว จึงทำการเก็บเซลล์แบคทีเรียมาทำให้ผนังเซลล์แตกและทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ในรูปแบบ native เพื่อนำโปรตีนไปทดสอบคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรียต่อไป

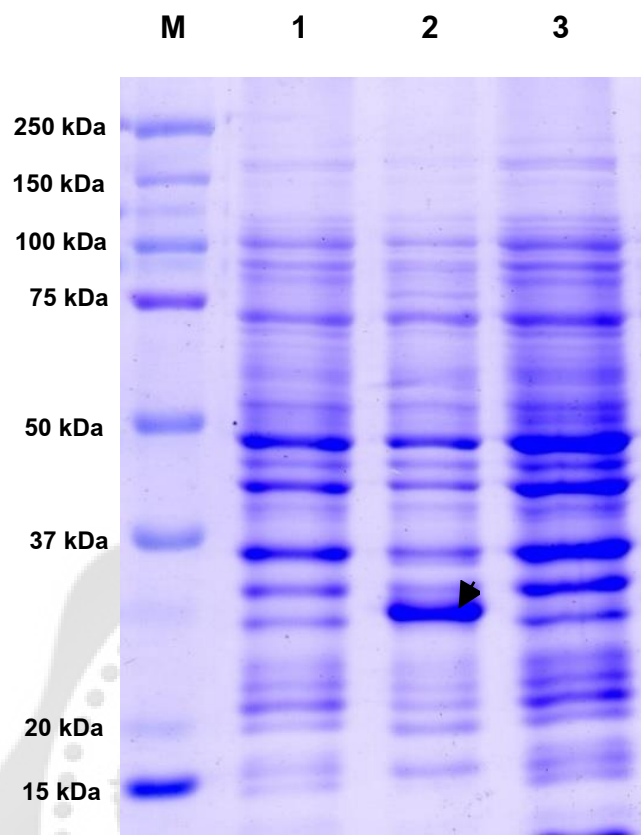


ภาพประกอบ 42 ผลผลิต PCR ของ MrHC-C และการวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pQE-30-MrHC-C

(A) คอลัมน์ที่ 1, 2 และ 3 ผลผลิต PCR ของ MrHC-C ขนาด 744 bp

(B) คอลัมน์ที่ 4 และ 5 การวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pQE-30-MrHC-C โดย
การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*II โดยพลาสมิด pQE-30 vector
มีขนาดประมาณ 3.4 kb ส่วน MrHC-C ขนาด 744 bp

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (2-log DNA ladder)



ภาพประกอบ 43 การตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน MrHC-C

โดยนำมาแยกใน 10% SDS-PAGE แล้วย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250

คอลัมน์ที่ 1 lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ M15 ที่ไม่มีพลาสมิด

คอลัมน์ที่ 2 lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ M15 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pQE-30-MrHC-C

คอลัมน์ที่ 3 lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ M15 ที่มีพลาสมิด pQE-30 vector

โดย M คือ โปรตีนมาตรฐาน

► คือ รีคอมบิแนนท์โปรตีน MrHC-C ขนาดประมาณ 29 kDa

2.7.2 การทดสอบคุณสมบัติโปรตีน MrHC-C ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

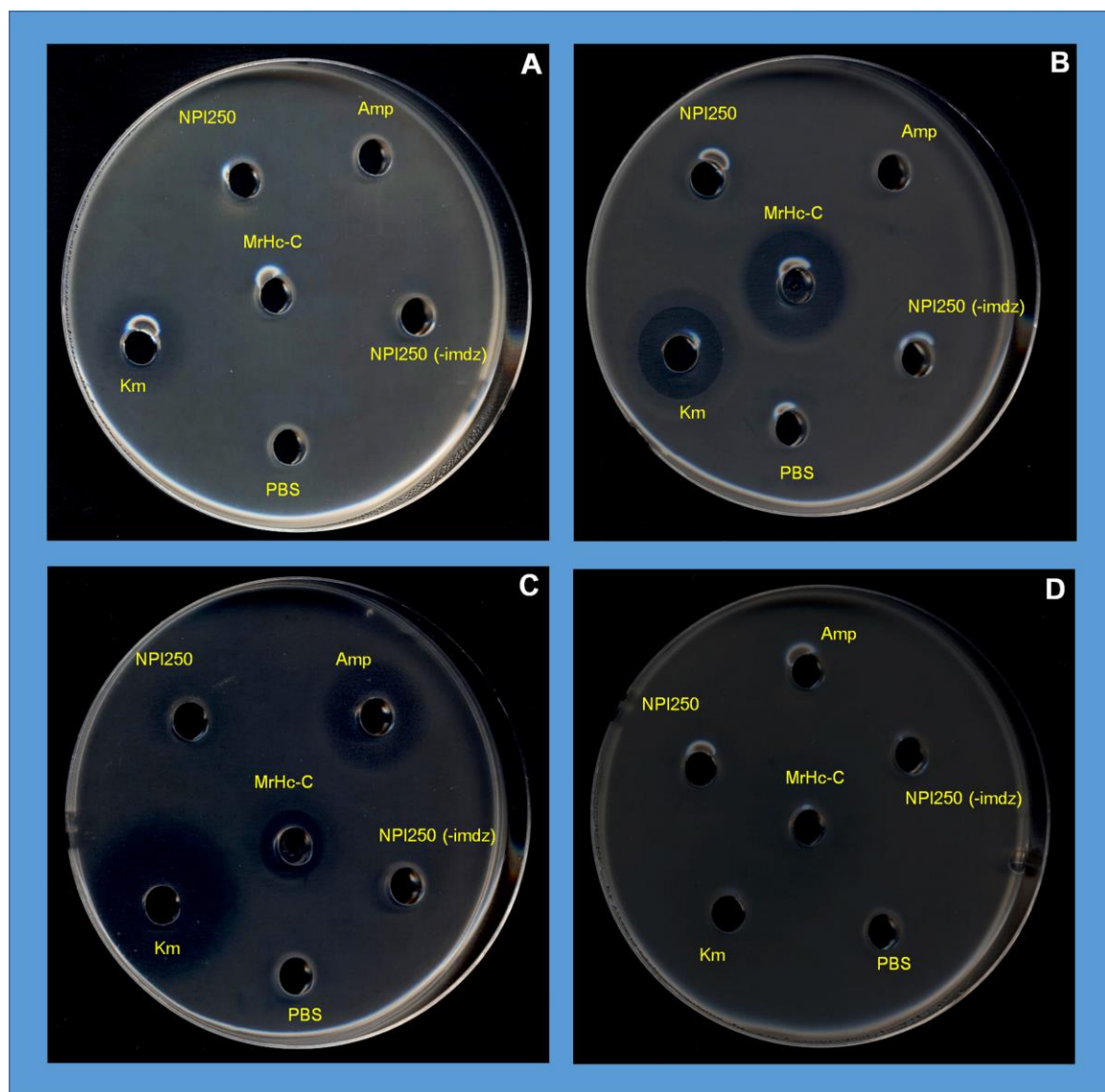
จากการทดสอบคุณสมบัติของโปรตีน MrHC-C ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion โดยใช้ยาปฏิชีวนะ kanamycin และ ampicillin เป็น positive control และใช้ PBS, บัฟเฟอร์ NPI 250 ที่มี 250mM imidazole และ บัฟเฟอร์ NPI 250 ที่ไม่มี imidazole เป็น negative control ในการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 4 ชนิด ได้แก่ *S. aureus*, *B. megaterium*, *B. subtilis* และ *B. cereus* พบว่าโปรตีน MrHC-C สามารถยับยั้งเชื้อ *B. megaterium* และ *B. cereus* โดยมีขนาด clear zone 0.97 ± 0.1 และ 1.87 ± 0.1 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตาราง 26 และภาพประกอบ 44)

นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ 9 ชนิด ได้แก่ *V. vulnificus*, *V. harveyi*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *A. caviae*, *A. veronii*, *A. hydrophila*, *E. coli* และ *E. coli* สายพันธุ์ M15 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pQE30-MrHC-C พบว่าโปรตีน MrHC-C สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *A. caviae*, *A. veronii* และ *A. hydrophila* โดยมีขนาด clear zone 3.07 ± 0.1 , 0.8 ± 0.1 , 0.9 ± 0.1 , 1.53 ± 0.1 และ 1.07 ± 0.2 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตาราง 26 และภาพประกอบ 45, 46 และ 47)

ตาราง 26 แสดงคุณสมบัติของโปรตีน MrHC-C ในการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยดูจาก
การเกิด clear zone (mean $\pm$ SD, n=3)

เชื้อแบคทีเรีย	ขนาด Clear zone (cm)					
	MrHC-C (25 μ g)	Amp (200 μ g)	Km (100 μ g)	NPI250	NPI250 (-imd)	PBS
<i>V. vulnificus</i> DMST 27426	4.03 $\pm$ 0.1 (3.07 $\pm$ 0.1)*	-	2.10 $\pm$ 0.1	0.96 $\pm$ 0.1	-	-
<i>V. harveyi</i> DMST 1526	-	-	1.40 $\pm$ 0.1	-	-	-
<i>V. mimicus</i> DMST 27430	-	-	1.33 $\pm$ 0.1	-	-	-
<i>V. parahemolyticus</i> DMST 22093	1.83 $\pm$ 0.1 (0.8 $\pm$ 0.1)*	-	1.90 $\pm$ 0.1	1.03 $\pm$ 0.1	-	-
<i>A. caviae</i> AHHR1 06103	2.07 $\pm$ 0.1 (0.9 $\pm$ 0.1)*	-	2.17 $\pm$ 0.1	1.17 $\pm$ 0.1	-	-
<i>A. veronii</i> DMST 21255	2.70 $\pm$ 0.2 (1.53 $\pm$ 0.1)*	-	0.90 $\pm$ 0.1	1.17 $\pm$ 0.1	-	-
<i>A. hydrophila</i> DMST 22095	2.57 $\pm$ 0.2 (1.07 $\pm$ 0.2)*	-	1.90 $\pm$ 0.1	1.50 $\pm$ 0.2	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	2.50 $\pm$ 0.1	1.03 $\pm$ 0.1	-	-	-
pQE30-MrHC-C in <i>E. coli</i> strains M15	-	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	-	-	1.10 $\pm$ 0.1	-	-	-
<i>B. cereus</i> ATCC 11787	1.87 $\pm$ 0.1	-	1.47 $\pm$ 0.1	-	-	-
<i>B. megaterium</i>	0.97 $\pm$ 0.1	2.03 $\pm$ 0.1	2.37 $\pm$ 0.1	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ MrHC-C ความเข้มข้นสุดท้าย 25 ไมโครกรัม
 Amp หมายถึง ampicillin ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครกรัม
 Km หมายถึง kanamycin ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัม
 NPI250 หมายถึง บัฟเฟอร์ NPI250
 NPI250 (-imd) หมายถึง บัฟเฟอร์ NPI250 ที่ไม่มี imidazole
 - หมายถึง ไม่มี clear zone
 * หมายถึง ค่า clear zone ที่หักลบผลของ imidazole ในบัฟเฟอร์
 NPI250 ออกแล้ว



ภาพประกอบ 44 การทดสอบคุณสมบัติของโปรตีน MrHC-C ในการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *B. subtilis* (A), *B. cereus* ATCC 11787 (B), *B. megaterium* (C) และ *S. aureus* ATCC 25923 (D)

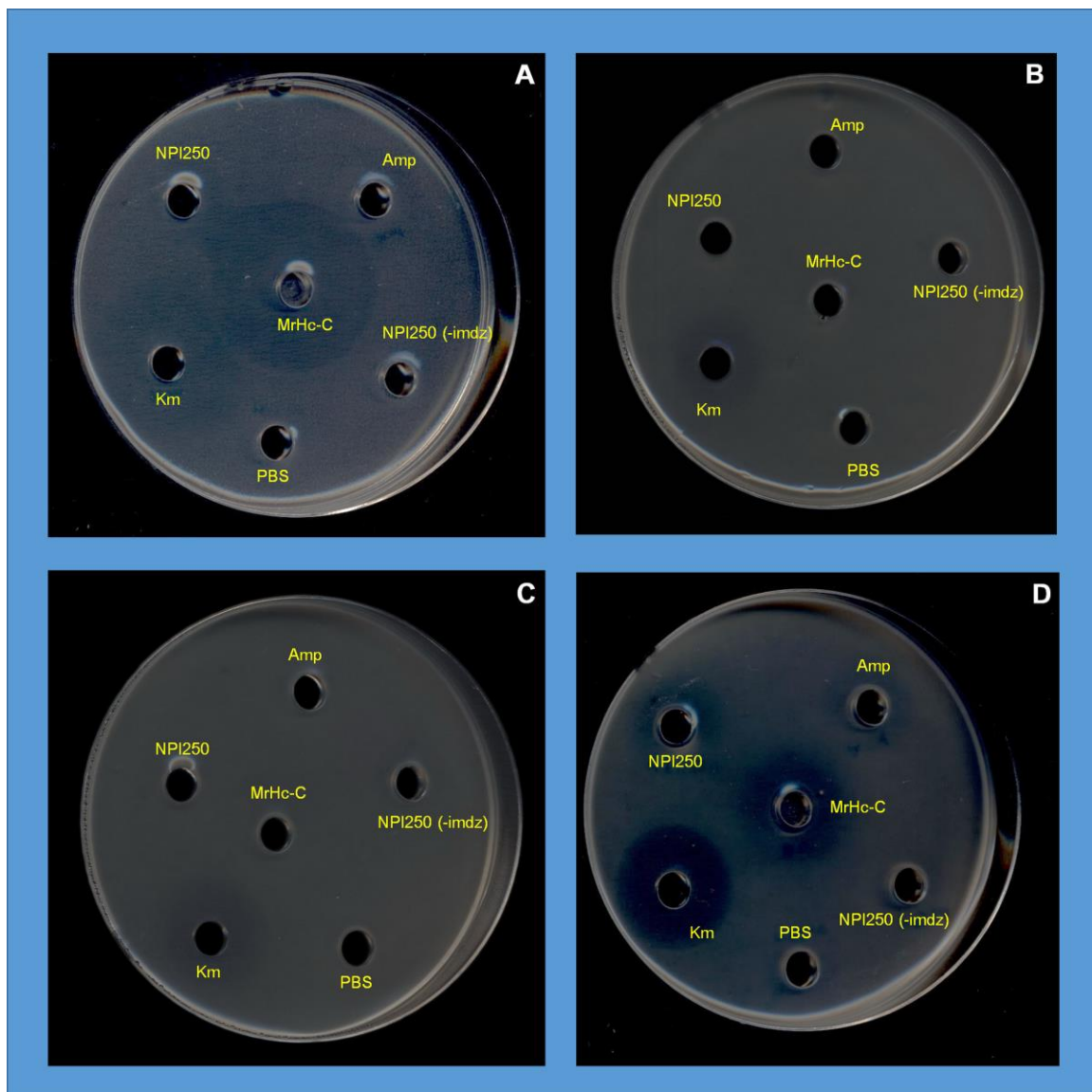
โดยใช้โปรตีน MrHC-C ความเข้มข้นสุดท้าย 25 ไมโครกรัม

Amp แทน ampicillin ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครกรัม

Km แทน kanamycin ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัม

NPI250 แทน บัฟเฟอร์ NPI250

NPI250 (-imd) แทน บัฟเฟอร์ NPI250 ที่ไม่มี imidazole



ภาพประกอบ 45 การทดสอบคุณสมบัติของโปรตีน MrHC-C ในการต้านการเจริญของเชื้อ

แบคทีเรียแกรมลบ *V. vulnificus* DMST 27426 (A), *V. harveyi* DMST 1526 (B), *V. mimicus* DMST 27430 (C) และ *V. parahaemolyticus* DMST 22093 (D)

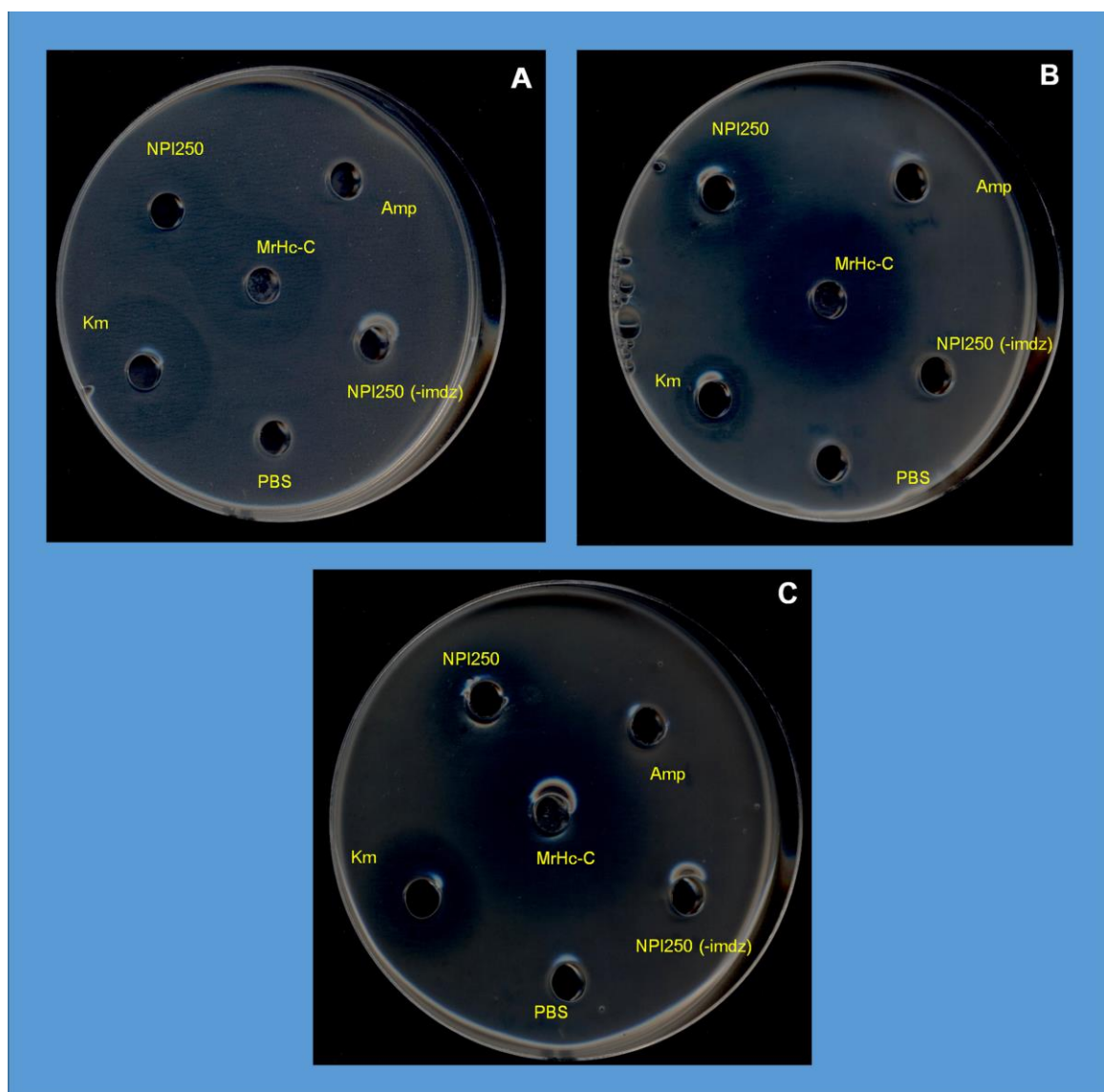
โดยใช้โปรตีน MrHC-C ความเข้มข้นสุดท้าย 25 ไมโครกรัม

Amp แทน ampicillin ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครกรัม

Km แทน kanamycin ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัม

NPI250 แทน บัฟเฟอร์ NPI250

NPI250 (-imdZ) แทน บัฟเฟอร์ NPI250 ที่ไม่มี imidazole



ภาพประกอบ 46 การทดสอบคุณสมบัติของโปรตีน MrHC-C ในการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย
แกรมลบ *A. caviae* AHHRI 06103 (A), *A. veronii* DMST 21255 (B) และ *A. hydrophila*
DMST 22095 (C)

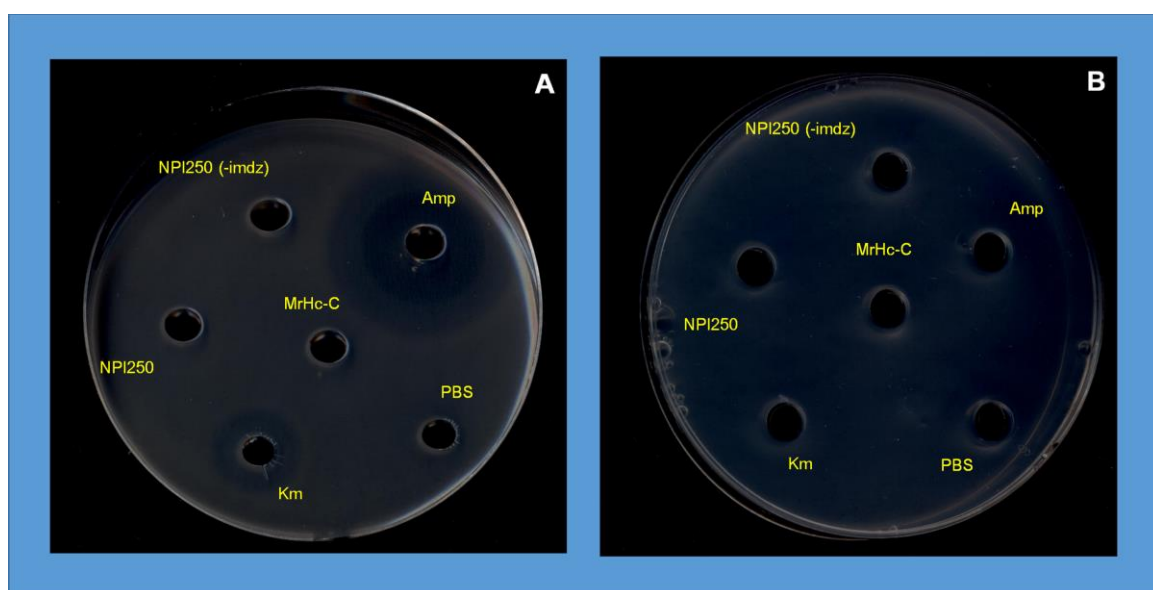
โดยใช้โปรตีน MrHC-C ความเข้มข้นสุดท้าย 25 ไมโครกรัม

Amp แทน ampicillin ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครกรัม

Km แทน kanamycin ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัม

NPI250 แทน บัฟเฟอร์ NPI250

NPI250 (-imd) แทน บัฟเฟอร์ NPI250 ที่ไม่มี imidazole



ภาพประกอบ 47 การทดสอบคุณสมบัติของโปรตีน MrHC-C ในการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย
แกรมลบ *E. coli* ATCC 25922 (A) และ *E. coli* สายพันธุ์ M15 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด
pQE30-MrHC-C (B)

โดยใช้โปรตีน MrHC-C ความเข้มข้นสุดท้าย 25 ไมโครกรัม

Amp แทน ampicillin ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครกรัม

Km แทน kanamycin ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัม

NPI250 แทน บัฟเฟอร์ NPI250

NPI250 (-imd) แทน บัฟเฟอร์ NPI250 ที่ไม่มี imidazole

บทที่ 5

สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาคุณสมบัติของ MrToll

ตัวรับ Toll (Toll receptor) จัดอยู่ในตระกูล pattern recognition receptor (PRR) ซึ่งมีการวิวัฒนาการมายาวนาน พบครั้งแรกในแมลงหวี่ *Drosophila melanogaster* (Anderson; & Nüsslein. 1984: 223-227) โดยมีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ต่อมา มีการค้นพบ Toll like receptors (TLRs) ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง ซึ่งมีความคล้ายกับ Toll receptor ในแมลงหวี่ โดย TLRs จัดเป็นศูนย์กลางของระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด นอกจากนี้ยังเป็นตัวกลางเชื่อมระหว่างระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดกับระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Akira; & Takeda. 2004: 499-511) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม TLRs จะจดจำและตอบสนองต่อองค์ประกอบต่างๆ ของแบคทีเรีย ไวรัส และ เชื้อรา ปัจจุบันมีรายงานการค้นพบ Toll receptor ในกิ้ง 4 ชนิด ได้แก่ กิ้ง *L. vannamei* พบ LvToll1 LvToll2 และ LvToll3 (Yang; et al. 2007: 1999-2008, Wang; et al. 2012: 359-371) กิ้ง *F. chinensis* พบ FcToll (Yang; et al. 2008: 564-574) กิ้ง *P. monodon* พบ PmToll (Arts; et al. 2006: 504-513) และกิ้ง *M. japonicus* พบ MjToll1 (Mekata; et al. 2008: 122-133) และ MjToll2 (accession number BAG68890) แต่ยังไม่มียางานเกี่ยวกับ *Toll receptor* ในกิ้งก้ามกราม การศึกษานี้ได้แยกยีน *Toll receptor* ของกิ้งก้ามกรามได้สำเร็จ และให้ชื่อว่า *MrToll* ซึ่งมีกรอบการอ่านที่มีความยาว 2,799 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน ความยาว 932 หน่วย โปรตีน MrToll ประกอบด้วยบริเวณต่างๆ ที่เป็นคุณสมบัติจำเพาะของโปรตีน Toll โดยมีส่วนของ extracellular domain ที่ประกอบด้วย leucine-rich repeats (LRRs) 15 บริเวณ พบ cysteine-rich motif อยู่ภายในบริเวณ LRR-NT และ LRR-CT region มีส่วนของกรดอะมิโนที่เป็น transmembrane segment 23 หน่วย และส่วนของ cytoplasmic Toll/Interleukin-1R (TIR) domain ความยาว 139 หน่วย นอกจากนี้บริเวณ ectodomain ของ MrToll พบ potential N-linked glycosylation sites 9 ตำแหน่ง โดย N₂₃₃ ของ LRR4, N₂₈₁ ของ LRR6 และ N₆₂₈ ของ LRR14 พบอยู่บริเวณส่วนหัวของโครงสร้างทุติยภูมิของ MrToll สอดคล้องกับรายงานของ Yang และคนอื่นๆ ซึ่งรายงานเกี่ยวกับโปรตีน FcToll ที่พบบริเวณ N-linked glycosylation sites 12 ตำแหน่ง โดยมี 3 ตำแหน่งพบอยู่บริเวณส่วนหัวของโครงสร้างทุติยภูมิของ FcToll (Yang; et al. 2008: 564-574) จึงสรุปได้ว่า MrToll มีความเกี่ยวข้องกับ receptor-ligand binding ที่ตำแหน่งดังกล่าว นอกจากนี้กรณีของคน TLR2 ต้องผ่านกระบวนการ glycosylation เพื่อการสังเคราะห์และการหลั่งออกได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Weber; Morse; & Gay. 2004: 34589-34594) เช่นเดียวกับ TLR4 ต้องผ่านกระบวนการ glycosylation เพื่อการแสดงออกที่ผิวเซลล์ (Ohnishi; Muroi; & Tanamoto. 2003: 205-410) อาจเป็นไปได้ว่ากระบวนการ glycosylation มีความจำเป็นต่อการแสดงออกของ MrToll อย่างไรก็ดีตามยังต้องมีการศึกษาความสำคัญของกระบวนการ glycosylation เพิ่มเติม

Bell และคนอื่นๆ เสนอว่า กรดอะมิโนที่แทรกอยู่ภายใน LRRs ที่ตำแหน่ง 10 หรือ 15 มีความจำเป็นสำหรับการจดจำ PAMP (Bell; et al. 2003: 528-533) ใน MrToll พบกรดอะมิโน 15 หน่วย แทรกอยู่ที่ LRRs ตำแหน่งที่ 10 ซึ่งคล้ายกับโปรตีน Toll ในกิ้งกชชนิดอื่นๆ เช่น พบกรดอะมิโน 7 หน่วย แทรกอยู่ที่ LRRs ตำแหน่งที่ 10 ของ LvToll1 ในกิ้ง *L. vannamei* (Yang; et al. 2007: 1999-2008) และ พบกรดอะมิโน 12 ตัว แทรกอยู่ที่ LRRs ตำแหน่ง ที่ 10 ของ FcToll ในกิ้ง *F. chinensis* (Yang; et al. 2008: 564-574) อย่างไรก็ตามยังต้องมีการศึกษาหน้าที่ของกรดอะมิโนที่แทรกอยู่ที่บริเวณ PAMP binding เพิ่มเติม

จากการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของยีน *MrToll* ที่บริเวณปลาย 5' (*MrToll* 5'-UTR) พบบริเวณ nuclear factor-kappa B (NF- κ B)-like element แต่ไม่พบบริเวณ TATA box และ CAT box ซึ่งกรณีหนู *Mus Musculus* ที่บริเวณ NF- κ B และ Sp1 elements จำเป็นสำหรับการกระตุ้นกระบวนการ transcription ของ TLR2 ใน macrophages หลังจากที่ถูกติดเชื้อ *Mycobacterium avium* แม้ไม่พบบริเวณ TATA box ก็ตาม (Wang; Lafuse; & Zwillig. 2001: 6924-6932) อย่างไรก็ตามยังต้องมีการศึกษาการทำงานของ NF- κ B-like element ใน *MrToll* ต่อไป

บริเวณ TIR domain เป็นบริเวณที่มีการอนุรักษ์ร่วมกันเนื่องจากเป็นบริเวณ protein-protein interaction domain ซึ่งเป็นตัวกลางในการส่งสัญญาณต่างๆ ภายในเซลล์ (signal transduction process) จากการวิเคราะห์โครงสร้างบริเวณ core ของ TIR domain จะเริ่มต้นด้วยกรดอะมิโน (F/Y)DA ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการอนุรักษ์และจบลงด้วย FW motif ที่อยู่ห่างประมาณ 8 ตำแหน่งจากปลาย C (Xu; et al. 2000: 111-115) สำหรับบริเวณ TIR domain ของ MrToll เริ่มต้นที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 788 ถึง 926 โดยพบกรดอะมิโนเริ่มต้นคือ KFDA และสิ้นสุดด้วยกรดอะมิโน 10 หน่วยที่อยู่หลังบริเวณอนุรักษ์ FW motif นอกจากนี้ที่ตำแหน่งที่ 829 พบกรดอะมิโน proline ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีการอนุรักษ์ของบริเวณ TIR domain ของโปรตีน Toll ในกิ้งกชชนิดอื่นๆ อีกด้วย ยกเว้น LvToll3 จะมีการแทนที่กรดอะมิโน proline ด้วยกรดอะมิโน valine ซึ่งในกรณีของแมลงหวี่ *Drosophila* และยุง *Aedes aegypti* แสดงให้เห็นว่าการแทนที่กรดอะมิโน proline ด้วยกรดอะมิโน valine ไม่กระทบต่อการทำงานของบริเวณ TIR domain (Luna; et al. 2003: 67-74) ดังนั้น MrToll อาจจะมี ความเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (signaling cascade) นอกจากนี้ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนแสดงให้เห็นว่าบริเวณ TIR domain ของ MrToll มีความคล้ายคลึงกันสูงกับโปรตีน Toll ของกิ้งกชชนิดอื่นๆ

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Toll (Full-length amino acid) ของกิ้งกชชนิดต่างๆ แสดงให้เห็นว่า MrToll มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ Toll1 ของกิ้งกชชนิดต่างๆ ซึ่งประกอบด้วย FcToll, PmToll, LvToll1, และ MjToll1 แต่จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบริเวณ ORF ของ MrToll พบว่ามีความเหมือนกับ Toll1 type ของกิ้งเพียงร้อยละ 48-49 ขณะที่ ORF ของ Toll1 ของกิ้งกชชนิดต่างๆ จะมีความเหมือนกันสูงถึงร้อยละ 82-94 นอกจากนี้บริเวณ ectodomain ของ MrToll มีความเหมือนกับ Toll1 type ของกิ้งเพียงร้อยละ

38-39 ขณะที่ ectodomain ของ Toll1 ของกุ้งชนิดต่างๆ จะมีความเหมือนสูงถึงร้อยละ 77-92 ด้วยเหตุนี้จึงอาจเป็นไปได้ว่าโปรตีน MrToll อาจจัดอยู่ใน class ใหม่ของโปรตีน Toll receptor ในกุ้ง

สำหรับการแสดงออกของยีน *MrToll* พบการแสดงออกในเนื้อเยื่อต่างๆ หลายชนิด โดยจะแสดงออกมากใน hemocytes, stomach, gill และ muscle แต่จะแสดงออกต่ำใน hepatopancreas ซึ่งคล้ายกับการแสดงออกของยีน *LvToll1* และ *LvToll3* ของกุ้ง *L. vannamei* (Yang; et al. 2007: 1999-2008, Wang; et al. 2012: 359-371), *FcToll* ของกุ้ง *F. chinensis* (Yang; et al. 2008: 564-574) และ *MjToll2* ของกุ้ง *M. japonicus* (Mekata; et al. 2008: 122-133)

เนื่องจากกลไกการป้องกันตัวของกุ้งจะใช้ primary immune response ซึ่งจัดเป็น non-specific cellular immunity ดังนั้น hemocytes ของกุ้ง จึงเป็นด่านแรกของกระบวนการป้องกันตัว (Johansson; & Söderhäll. 1989: 171-176, Hose; & Martin. 1989: 335-346, Bachèr; et al. 1995: 17-32) ดังนั้น hemocytes จึงมักนำมาใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันของกุ้ง นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของยีน *MrToll* สูงใน hemocytes ของกุ้ง *M. rosenbergii* อีกด้วย งานวิจัยนี้จึงใช้ hemocyte ในการศึกษาหน้าที่ของ MrToll โดยฉีดกุ้งด้วย *A. caviae* เนื่องจาก *A. caviae* เป็นหนึ่งในแบคทีเรียก่อโรคที่พบมากในกุ้ง *M. rosenbergii* (Sung; Hwang; & Tasi. 2000: 278-284) โดยหลังจากฉีดกุ้งด้วย *A. caviae* พบว่ายีน *MrToll* มีการแสดงออกสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 3 ถึง 12 และระดับการแสดงออกจะลดลงจนถึงระดับปกติในชั่วโมงที่ 24 ถึง 48 ซึ่งตรงกับรายงานก่อนหน้านี้ที่พบว่าการแสดงออกของยีน *FcToll* มีการแสดงออกสูงขึ้นหลังจากฉีดกุ้งด้วย *V. anguillarum* และยังคงสูงถึงชั่วโมงที่ 5 (Yang; et al. 2008: 564-574) ส่วนการแสดงออกของยีน *MjToll2* พบว่าในชั่วโมงที่ 12 มีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้น 76 เท่าหลังจากกุ้งถูกกระตุ้นด้วย peptidoglycan (Mekata; et al. 2008: 122-133)

การศึกษาทบทวนหน้าที่ของยีน *MrToll* โดยการ knock-down ยีน *MrToll* พบว่า กุ้งกลุ่มที่ถูก knock-down ด้วย dsRNA-Toll แต่ไม่ได้ถูกฉีดด้วยแบคทีเรีย แม้ว่าการแสดงออกของยีน *MrToll* จะลดลง แต่ก็ไม่มีผลต่อความอยู่รอดของกุ้ง ในทางตรงกันข้ามกุ้งในกลุ่ม ที่ถูก knock-down ด้วย dsRNA-Toll เมื่อถูกฉีดด้วย *A. caviae* พบว่าจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย (CFU) และอัตราการตายของกุ้งเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ จากผลงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า MrToll มีความเกี่ยวข้องกับการป้องกันเชื้อโรคในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อเชื้อ *A. caviae* ในกรณีของการทดลอง knock-down ยีน *LvToll1* จากนั้นฉีดกุ้งด้วยเชื้อ *V. harveyi* พบว่าให้ผลเช่นเดียวกัน (Wang; et al. 2010: 49-58) จึงเสนอว่า MrToll และ LvToll1 อาจใช้กลไกการป้องกันต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่คล้ายกัน

ในแมลงพบว่าโปรตีน Toll มีความเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันจุลินทรีย์โดยวิธี phagocytosis (Hultmark. 2003: 12-19, Valanne; Wang; & Rämet. 2011: 649-656) ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของจำนวนแบคทีเรียในกุ้งกลุ่มที่ถูก knock-down ด้วย dsRNA-Toll และถูกฉีดด้วยเชื้อ *A. caviae* อาจเกิดจากการที่มีกระบวนการ phagocytosis ลดลงเนื่องจาก MrToll ถูกยับยั้งการแสดงออก

ปัจจุบันพบว่าโปรตีน Toll ในกิ้งก่าทุกชนิดจะประกอบด้วย signal peptide แต่กรณีของโปรตีน MrToll ไม่พบบริเวณ signal peptide จึงนำไปสู่สมมติฐานว่าโปรตีน MrToll อาจแสดงออกภายในเซลล์คล้ายกับกรณีของ TLR3 และ TLR7 ที่ไม่แสดงออกบนผิวเซลล์แต่พบการแสดงออกใน endosomal โดย TLR3 และ TLR7 มีหน้าที่ตรวจจับ dsRNA และ ssRNA ของไวรัส ตามลำดับ (Akira; & Takeda. 2004: 499-511) ในกรณีของปลา TLR3 จะจับกับไวรัสและแบคทีเรียซึ่งแตกต่างจาก TLR3 ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นอกจากนี้พบการแสดงออกของ TLR3 เพิ่มขึ้นในปลา zebrafish (Phelan; Mellon; & Kim. 2005: 1057-1071) และปลา channel catfish (Bilodeau; & Waldbieser. 2005: 713-721) หลังจากที่ถูกปลาติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ดังนั้น MrToll จึงอาจมีความเกี่ยวข้องกับการป้องกันเชื้อโรคในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อเชื้อ

A. caviae

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่สามารถแยกยีน *MrToll* ของกิ้ง *M. rosenbergii* โดยพบว่าบริเวณ TIR domain มีความคล้ายสูงกับ TIR domain ของกิ้งชนิดอื่นๆ นอกจากนี้พบว่า MrToll มีการแสดงออกในหลายๆ อวัยวะของกิ้ง และเมื่อฉีดกิ้งด้วยเชื้อแบคทีเรียจะพบการแสดงออกของ MrToll ใน hemocytes สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ จากการทดลองเพื่อศึกษาหน้าที่ของ MrToll โดยวิธีการ knock-down สรุปได้ว่า MrToll มีความเกี่ยวข้องกับการป้องกันเชื้อโรคในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อเชื้อ *A. caviae* และจากการวิเคราะห์ ORF ของ MrToll และ ectodomain ของ MrToll ให้ข้อสรุปว่า โปรตีน MrToll อาจจัดอยู่ใน class ใหม่ของโปรตีน Toll receptor ในกิ้ง

2. การศึกษาคุณสมบัติของ MrHC

hemocyanin เป็นโปรตีนเชิงซ้อนที่ประกอบด้วยหลายหน่วยย่อยพบใน hemolymph โดยเกี่ยวข้องกับระบบหายใจและระบบภูมิคุ้มกันในครัสเตเชียน (Adachi; et al. 2005: 136-143, Van Holde; & Miller. 1995: 1-81, Sellos; Lemoine; & Wormhoudt. 1997: 153-158, Markl; & Decker. 1992: 325-376) ในครัสเตเชียนจะพบ hemocyanin รวมตัวกันประกอบด้วยหน่วยย่อยต่างๆ (Lei; et al. 2007: 808-813) โดยแต่ละหน่วยย่อยจะแบ่งออกเป็น 3 โดเมน คือ hemocyanin-all-alpha domain, hemocyanin-copper containing domain และ hemocyanin-immunoglobulin-like domain (Holde; Miller; & Decker. 2001: 15563-66, Burmester. 2002: 95-107) ปี 1997 มีรายงานเกี่ยวกับการแยกยีน *hemocyanin* ของกุ้ง *P. vannamei* โดยใช้ cDNA library ที่เตรียมจาก hepatopancreas ของกุ้งเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ พบว่ายีน *hemocyanin* ยาว 2,095 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีความเหมือนสูงเมื่อเทียบกับยีน *hemocyanin* ของกุ้ง *P. interruptus* (Sellos; et al. 1997: 153-158) ในปีเดียวกัน Durstewitz และ Terwilliger ทำการโคลนยีน *hemocyanin* หน่วยย่อยที่ 6 ของปู *C. magister* (Cmag6) ความยาว 1,939 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนความยาว 650 หน่วย มีมวลโมเลกุล 74.9 kDa (Durstewitz; & Terwilliger. 1997: 266-276) ต่อมามีการศึกษายีน *hemocyanin* ของกุ้ง *P. japonicus* โดย Lei และคนอื่นๆ พบว่าสามารถโคลนหน่วยย่อยของยีน *hemocyanin* ได้ 2 ยีน คือ PjHcL และ PjHcY ซึ่งแปลรหัสเป็นโปรตีนความยาว 678 และ 664 หน่วย มีมวลโมเลกุล 75 และ 73 kDa ตามลำดับ (Lei; et al. 2007: 808-813) และในปี 2012 Wang และคนอื่นๆ รายงานเกี่ยวกับยีน *hemocyanin* ของกุ้ง *M. nipponense* พบว่ายีน *hemocyanin* ยาว 2,151 นิวคลีโอไทด์ ถอดรหัสให้กรดอะมิโน 663 หน่วย มีมวลโมเลกุล 76.6 kDa (Wang; et al. 2012: 348–355)

การศึกษานี้เป็นรายงานแรกที่สามารถแยกยีน *hemocyanin* ของกุ้งก้ามกรามได้สำเร็จและให้ชื่อว่า MrHC โดยยีน MrHC มีกรอบการอ่านที่มีความยาว 1,992 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นโปรตีนความยาว 663 หน่วย โดยโปรตีน MrHC มีมวลโมเลกุล 76.5 kDa ประกอบด้วยบริเวณต่างๆ ที่เป็นคุณสมบัติของ hemocyanin superfamily โดยพบบริเวณ hemocyanin-all-alpha domain ความยาว 124 หน่วย, hemocyanin-copper containing domain ความยาว 258 หน่วย และ hemocyanin-immunoglobulin-like domain ความยาว 248 หน่วย (ภาพประกอบ 25) จากการวิเคราะห์ ORF ของ MrHC พบว่าร้อยละ 96-99 มีความเหมือน (identity) กับ hemocyanin ของกุ้งชนิดอื่นๆ และผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการพบว่า MrHC มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ hemocyanin ของ กุ้ง *M. nipponense*, hemocyanin 2 ของกุ้ง *P. leniusculus* และ hemocyanin alpha-subunit α ของกุ้ง *H. americanus*

การศึกษาการแสดงออกของ *hemocyanin* ในกุ้งชนิดต่างๆ พบว่า *hemocyanin* มีการแสดงออกสูงใน hepatopancreas ของกุ้ง *M. nipponense* (Wang; et al. 2012: 348–355) และ *L. vannamei* (Wang; Chang; & Chen. 2007: 1161-77) ส่วนการแสดงออกของยีน MrHC พบว่ามี

การแสดงออกไม่แตกต่างกันในอวัยวะต่างๆ แต่จะพบการแสดงออกของยีน *MrHC* ใน hepatopancreas สูงกว่าอวัยวะอื่นเล็กน้อย

มีรายงานว่าโปรตีน hemocyanin ที่แยกได้จากกุ้ง *P. monodon* มีคุณสมบัติเป็น antiviral agent ต่อดีเอ็นเอไวรัสและอาร์เอ็นเอไวรัส (Zhang; Huang; & Qin. 2004: 93-99) สำหรับงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *hemocyanin* โดยหลังจากฉีดเชื้อไวรัส *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*MrNV*) พบว่าในวันที่ 2 หลังจากกุ้งได้รับเชื้อไวรัส ยีน *MrHC* มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้น 237 เท่า สอดคล้องกับงานวิจัยของ Havanapan และคนอื่นๆ ที่ศึกษาการกลไกการป้องกันของกุ้ง *L. vannamei* ในระหว่างที่กุ้งติดเชื้อ Taura syndrome virus (TSV) พบว่าโปรตีนทางปลาย C ของ hemocyanin มีการแสดงออกสูงขึ้น (Havanapan; et al. 2009: 2476-2483) เมื่อไม่นานมานี้ Pavlina และคนอื่นๆ ได้ศึกษาความสำคัญของโอลิโกแซคคาไรด์และคาร์โบไฮเดรตที่บริเวณ N-link glycosylation ของโปรตีน hemocyanin ในหอย *Rapana venosa* (RvH) พบว่า กระบวนการ glycosylation ที่เกิดขึ้นทำให้ RvH มีคุณสมบัติ antiviral properties ต่อไวรัส respiratory syncytial virus (RSV) ขณะที่ RvH ที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการ glycosylation โปรตีน RvH จะไม่สามารถต้านเชื้อไวรัส RSV ได้ (Pavlina; et al. DOI: 10.1021/bc900034k) ซึ่งการพบบริเวณ N-linked glycosylation site ที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 509 (NGSW) บน MrHC อาจเป็นไปได้ว่าเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติ antiviral properties ต่อ ไวรัส *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*MrNV*)

นอกจาก hemocyanin ที่แยกได้จากกุ้งจะมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อไวรัสแล้ว ยังมีรายงานพบว่าโปรตีนทางปลาย C ของ hemocyanin มีคุณสมบัติ antifungal activities โดยพบการแสดงออกในชั่วโมงแรกเมื่อกุ้ง *L. vannamei* และ *L. stylirostris* ติดเชื้อรา (Durstewitz; et al. 2001: 47070-77) และในปี 2016 มีรายงานเกี่ยวกับ hemocyanin ของกุ้ง *L. vannamei* (PvHCt) โดยปลาย C ของ hemocyanin มีคุณสมบัติ histidine-rich antimicrobial peptide สามารถตอบสนองต่อจุลินทรีย์ ซึ่งจัดเป็น antifungal peptide ที่มีโครงสร้างเป็น amphipathic α -helical structure สามารถจับและแทรกเข้าสู่เมมเบรนของเชื้อราได้ ตอบสนองต่อเชื้อรา *Fusarium oxysporum* โดยการสะสมของ PvHCt ที่ผิวหน้าของ hyphae ของเชื้อรา จากนั้นแทรกเข้าสู่พลาสมาเมมเบรน เกิดการทำลายความสมบูรณ์ของผนังเซลล์ของเชื้อรา ชักน้ำให้เซลล์ตายในที่สุด (Petit; et al. 2016: 557-568) นอกจากนี้มีรายงานว่าโปรตีน hemocyanin ที่แยกได้จากกุ้ง *L. vannamei* สามารถรวมตัวกับแบคทีเรียก่อโรคในกุ้ง 8 สายพันธุ์ (Zhang; et al. 2006: 815-821) ในปี 2010 มีรายงานเกี่ยวกับการแสดงออกของยีน *hemocyanin* ของกุ้ง *P. monodon* สูงขึ้นหลังจากฉีดกุ้งด้วย *V. harveyi* (Somboonwiwat; et al. 2010: 39-50) ต่อมางานวิจัยของ Wang และคนอื่นๆ แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของยีน *hemocyanin* ของกุ้ง *M. nipponense* เพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 3 หลังจากฉีดด้วย *A. hydrophila* (Wang; et al. 2012: 348-355) และในปีเดียวกันมีรายงานเกี่ยวกับบริเวณ variable region ของปลาย C ของโปรตีน hemocyanin ในกุ้ง *L. vannamei* โดย Zhao และคนอื่นๆ

พบ SNPs ภายใน variable region โดยสามารถแยก SNPs 4 ตำแหน่งได้จากกึ่งที่ต้านทานการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่ง 3 ใน 4 ของ SNPs อาจทำให้โครงสร้างปฐมภูมิและทุติยภูมิของโปรตีน hemocyanin เปลี่ยนแปลงไปส่งผลให้เกิดกระบวนการ agglutinative activity ต่อแบคทีเรียก่อโรคเพิ่มสูงขึ้น จึงอาจเป็นไปได้ว่าความสามารถในการต้านทานการติดเชื้อแบคทีเรียของกึ่ง *L. vannamei* อาจเกิดจากความแตกต่างของบริเวณ SNPs ทางปลาย C ของโปรตีน hemocyanin (Zhao; et al. 2012: 403-410) ต่อมา Zhuang และคนอื่นๆ ได้ศึกษาเกี่ยวกับ antimicrobial region ที่อยู่ระหว่างบริเวณ α -helical domain และ β -sheet domain ของ hemocyanin ในหอย *Halotis tuberculata* พบว่าเปปไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้นสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกได้ จึงเสนอว่าโปรตีน hemocyanin ในหอยอาจทำหน้าที่เป็นแหล่งของเปปไทด์ที่ช่วยในการป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรีย (Zhuang; et al. 2015: 96-102)

จากงานวิจัยที่กล่าวมาสรุปได้ว่า hemocyanin มีบทบาทที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกึ่งมากมาย งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาคุณสมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งผลการทดสอบคุณสมบัติการต้านจุลชีพด้วยวิธี agar well diffusion พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน MrHC บริเวณ immunoglobulin-like domain มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *B. cereus* และ *B. megaterium* โดยมี clear zone 1.87 ± 0.1 และ 0.97 ± 0.1 เซนติเมตร ตามลำดับ สำหรับในส่วน of แบคทีเรียแกรมลบ พบว่าบัฟเฟอร์ NPI250 ที่มี 250mM imidazole สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ 5 ชนิด ได้แก่ *V. vulnificus*, *V. parahemolyticus*, *A. caviae*, *A. veronii* และ *A. hydrophila* โดยมีขนาด clear zone 0.96 ± 0.1 , 1.03 ± 0.1 , 1.17 ± 0.1 , 1.17 ± 0.1 และ 1.50 ± 0.2 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยแบคทีเรียดังกล่าวข้างต้นเมื่อทดสอบกับบัฟเฟอร์ NPI250 ที่ไม่มี imidazole จะไม่พบ clear zone อาจเนื่องมาจาก imidazole จัดเป็นสารประกอบเฮเทอโรไซคลิก มีรายงานระบุว่าอนุพันธ์ของ imidazole หลายชนิดมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ เช่น ฤทธิ์การต้านเชื้อรา และ ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น (Kumari; Pramod; & Nitin. 2010: 36-47) ซึ่งบัฟเฟอร์ NPI250 เป็นบัฟเฟอร์ที่ใช้สำหรับชะรีคอมบิแนนท์โปรตีน MrHC ในรูป native ออกจากคอลัมน์ Ni-NTA Superflow columns ดังนั้นจึงช่วยเสริมฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทำให้ clear zone มีขนาดกว้างกว่าปกติ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาเฉพาะฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของรีคอมบิแนนท์โปรตีน MrHC บริเวณ immunoglobulin-like domain (หลังหักลบ clear zone ที่เกิดจาก imidazole แล้ว) พบว่าสามารถยับยั้ง *V. vulnificus*, *V. parahemolyticus*, *A. caviae*, *A. veronii* และ *A. hydrophila*, โดยมี clear zone 3.07 ± 0.1 , 0.8 ± 0.1 , 0.9 ± 0.1 , 1.53 ± 0.1 และ 1.07 ± 0.2 เซนติเมตร ตามลำดับ จากผลงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า MrHC มีความเกี่ยวข้องกับการป้องกันเชื้อโรคในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก รวมถึงเชื้อไวรัส MNV ด้วย



บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2555). สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2553. กรุงเทพฯ: ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง กระทรวงฯ.
- กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2554). เอกสารวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร เศรษฐกิจการผลิตการตลาด กุ้งก้ามกราม. กรุงเทพฯ: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงฯ.
- จรีพร เรืองศรี. (2546). การตอบสนองแบบกึ่งจำเพาะของภูมิคุ้มกันกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon Fabricius*) ต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองและเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว. วิทยานิพนธ์ วท.ม. สงขลา: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. ถ่ายเอกสาร.
- ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร. (2551). พันธุวิศวกรรมและชีวสารสนเทศศาสตร์เบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: โอ.เอส.พรี้นติ้ง เฮ้าส์.
- มหาวิทยาลัยมหิดล. สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. (2552). คู่มือประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง เทคโนโลยี RNAi ในการป้องกันการติดโรคไวรัส. นครปฐม: สถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยฯ.
- แหล่งเรียนรู้ทางด้านประมง. (2555). การเลี้ยงสัตว์น้ำจืด : การเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. สืบค้นเมื่อ 1 มิถุนายน 2555, จาก <http://www.aquatoyou.com/index.php/2013-02-20-09-09-00/492-giant-fershwater-prawn>
- อาจารย์ เจียวก๊ก. (2551). การศึกษาสมบัติของฮีโมไซยานินในกุ้งแชบ๊วย. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (ชีวเคมี). สงขลา: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. ถ่ายเอกสาร.
- เอื้อมมนัส อินทรผาด. (2545). การค้นหายีนที่มีปฏิกริยากับไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์ วท.ม. สงขลา: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. ถ่ายเอกสาร.
- Adachi, K.; et al. (2001). Hemocyanin a most likely inducer of black spots in kuruma prawn *Penaeus japonicas* during storage. *Journal of food science*. 66: 1130-1136.
- Adachi, K.; et al. (2005). Hemocyanin in the exoskeleton of crustaceans: enzymatic properties and immunolocalization. *Pigment Cell Research*. 18: 136-143.
- Adamia, G.; et al. (2006). Absorption, distribution, and transformation of TNT in higher plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 64: 136–145.
- Akira, S.; & Takeda K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*. 4: 499–511.
- Akira, S.; Uematsu, S.; & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 124: 783–801.
- Anderson, K. V.; & Nüsslein, V. C. (1984). Information for the dorsal ventral pattern of the *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA. *Nature*. 311: 223-7.

- Arts, J. A.; et al. (2006). Molecular cloning and expression of a Toll receptor in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*. 23: 504-513.
- Aspan, A.; & Söderhäll, K. (1991). Purification of prophenoloxidase from crayfish blood cells, and its activation by an endogenous serine proteinase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 21: 363-373.
- Aspan, A.; et al. (1995). cDNA cloning of prophenoloxidase from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* and its activation. *the proceedings of the national academy of sciences USA*. 92: 932-943.
- Bachère, E.; et al. (1995). Knowledge and research prospects in marine mollusk and crustacean immunology. *Aquaculture*. 132: 17-32.
- Barracco, M. A.; Duvic, B.; & Söderhäll, K. (1991). The β -1,3-glucan-binding protein from the crayfish *Pacifastacus leniusculus*, when reacted with a β -1,3-glucan, induces spreading and degranulation of crayfish granular cells. *Cell and Tissue Research*. 226: 491-497.
- Bell, J. K.; et al. (2003). Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends in Immunology*. 24: 528-533.
- Belvin, M. P.; & Anderson, K. V. (1996). A conserved signaling pathway: the *Drosophila* Toll-Dorsal pathway. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 12: 393-416.
- Bilodeau, A. L.; & Waldbieser, G. C. (2005). Activation of TLR3 and TLR5 in channel catfish exposed to virulent *Edwardsiella ictaluri*. *Developmental and Comparative Immunology*. 29: 713-21.
- Bonami, J. R.; et al. (2005). White tail disease of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: separation of the associated virions and characterization of MrNV as a new type of nodavirus. *Journal of Fish Diseases*. 28:23-31.
- Bourchookarn, A.; et al. (2008) Proteomic analysis of altered proteins in lymphoid organ of yellow head virus infected *Penaeus monodon*. *Biochim BBA-Proteins and Proteomics*. 1784:504-511.
- Bowie, A.; & O'Neill, L. A. (2000). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *Journal of Leukocyte Biology*. 67(4): 508-514.

- Brouwer, M.; Bonaventura, C.; & Bonaventura, J. (1978). Analysis of the effect of three different allosteric ligands on oxygen binding by hemocyanin of the shrimp, *Penaeus setiferus*. *Biochemistry*. 17: 2148-2154.
- Buchanan, S. G. S.; & Gay, N. J. (1996). Structural and functional diversity in the leucine rich repeat family of proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 65: 1–44.
- Burmester, T. (2002). Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins. *The Journal of Comparative Physiology B*. 172(2): 95-107.
- Carlberg, I.; & Söderhäll, K. (1985). Phenoloxidase activity in *Daucus carota* is restricted to embryogenic cultures. *FEBS Letter*. 187: 295-298.
- Chen, H. Y.; et al. (2007) Identification of a female-specific hemocyanin in the mud crab, *Scylla olivacea* (Crustacea: Portunidae). *Zoology*. 46(2): 194-202.
- Cheng, W.; et al. (2005). Molecular cloning and characterisation of a pattern recognition molecule, lipopolysaccharide- and β -1,3-glucanbindingprotein (LGBP) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*. 18: 297–310.
- Cominetti, M. R.; et al. (2002). Characterization and partial purification of a lectin from the hemolymph of the white shrimp *Litopenaeus schmitti*. *Developmental and Comparative Immunology*. 26: 715–721.
- Cuff, M.; et al. (1998). Crystal structure of a functional unit from *Octopus* hemocyanin. *Journal of Molecular Biology*. 278: 855-870.
- De Haas, F.; & Van Bruggen, E. F. (1994) The interhexameric contacts in the four-hexameric hemocyanin from the tarantula *Eurypelma californicum*. *Journal of Molecular Biology*. 237: 464–478.
- Decker, H.; et al. (1989). Allosteric oxygen-binding properties of reassembled tarantula (*Eurypelma californicum*) hemocyanin with incorporated apo- or met-subunits. *Biological chemistry Hoppe-Seyler*. 370: 511-523.
- Decker, H.; & Rimke, T. (1998). Tarantula hemocyanin shows phenoloxidase activity. *Journal of Biological Chemistry*. 273: 25889-25892.
- Decker, H.; et al. (2001). SDS-induced phenoloxidase activity of hemocyanins from *Limulus polyphemus*, *Eurypelma californicum*, and *Cancer magister*. *Journal of Biological Chemistry*. 276: 17796-17799.

- Decker, H.; & Jaenicke, E. (2004). Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. *Developmental and Comparative Immunology*. 28: 673-687.
- Destoumieux, G.; et al. (2000). Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *Journal of Cell Science*. 113: 461-469
- Destoumieux, G.; et al. (2001). Crustacean Immunity. Antifungal peptides are generated from The C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *Journal of Biological Chemistry*. 276: 47070-47077.
- Dolashka-Angelova, P.; et al. (2005). Structure and stability of arthropodan hemocyanin *Limulus polyphemus*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 61: 1207-1217.
- Durstewitz, G.; & Terwilliger, N. B. (1997). cDNA cloning of a developmentally regulated hemocyanin subunit in the crustacean Cancer magister and phylogenetic analysis of the hemocyanin gene family. *Molecular Biology and Evolution - Oxford Journals*. 14(3): 266-276.
- Duvic, B.; & Söderhäll, K. (1990). Purification and partial characterization of a beta-1,3-glucan-binding-protein membrane receptor from blood cells of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Biological Chemistry*. 256: 27-32.
- Ellerton, H. D.; & Anderson, D. M. (1981). Subunit structure of the hemocyanin from the prawn *Penaeus monodon*. In: Invertebrate Oxygen-Binding proteins. Structure, Active Site and Function, Lamy, J. and Lamy, J., Eds. Marcel Dekker, New York, pp 159-165.
- Espin, J.; & Wichers, H. (1999). Activation of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoform by sodium dodecyl sulfate (SDS). Kinetic properties of the SDS-activated isoform. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47: 3518-3525.
- Fan, T.; et al. (2009). Identification and characterization of a hemocyanin-derived phenol-oxidase from the crab *Charybdis japonica*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 152B: 144-149.
- Figuerola-Soto, C. G.; et al. (1997) Purification of hemocyanin from White Shrimp (*Penaeus vannamei* Boone) by immobilized metal affinity chromatography synthesis by fat body and occurrence in hemolymph. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 117B: 203-208.

- Fire, A.; et al. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 19;391(6669): 806-811., from http://www.rnaiweb.com/RNAi/What_is_RNAi/
- Fire, A. (1999). RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet.* 15: 358-363.
- Flegel, T. W.; & Sritunyalucksana, K. (2011) Shrimp Molecular Responses to Viral Pathogens. *Marine Biotechnology*. 13: 587–607.
- Fujimoto, K.; et al. (1995) Nucleotide sequence of the cDNA encoding the proenzyme of phenol oxidase A1 of *Drosophila melanogaster*. *the proceedings of the national academy of sciences USA*. 92(17): 7769-7773.
- Garcia-Carreño, F. L.; Cota. K.; & Navarrete Del Toro, M. A. et al. (2008). Phenoloxidase activity of hemocyanin in whiteleg shrimp *Penaeus vannamei*: Conversion characterization of catalytic properties, and role in postmortem melanosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 15: 6454-6459.
- Gellissen, G.; Hennecke, R.; & Spindler, K. D. (1991) The site of synthesis of hemocyanin in the crayfish, *Astacus leptodactylus*. *Experientia*. 47: 194-195.
- Genc, S.; Koroglu, T. F.; & Genc, K. (2004). RNA interference in neuroscience. *Molecular Brain Research*. 132(2): 260-270.
- Gollas-Galvan, T.; Hernández-López, J.; Vargas-Albores, F. (1999) Prophenoloxidase from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) hemocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 122: 77-82.
- Hagner-Holler, S.; et al. (2005) Biochemical and molecular characterisation of hemocyanin from the amphipod *Gammarus roeseli*: complex pattern of hemocyanin subunit evolution in Crustacea. *Journal of Comparative Physiology*. 175B: 445-452.
- Hall, M.; et al. (1995) Proenzyme of *Manduca sexta* phenol oxidase: purification, activation, substrate specificity of the active enzyme, and molecular cloning. *the proceedings of the national academy of sciences USA*. 92(17): 7764-7768.
- Hall, T; et al. (2011). BioEdit: An important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences*. 2(1): 60-61.
- Han-Ching Wang, K. C.; et al. (2010). RNAi knock-down of the *Litopenaeus vannamei* Toll gene (*LvToll*) significantly increases mortality and reduces bacterial clearance after challenge with *Vibrio harveyi*. *Developmental and Comparative Immunology*. 34: 49–58.
- Havanapan, P.; et al. (2009). C-Terminal Hemocyanin from Hemocytes of *Penaeus*

- vannamei* interacts with ERK1/2 and Undergoes Serine Phosphorylation. *Journal of Proteome Research*. 8 (5): 2476–2483.
- Hazes, B.; et al. (1993) Crystal structure of deoxygenated *Limulus polyphemus* subunit II hemocyanin at 2.18 Å resolution: clues for a mechanism for allosteric regulation. *Protein Science*. 2: 597-619.
- Herskovits, T. T.; & Villanueva, G. B. (1986). Light scattering investigation of the subunit structure and dissociation of octopoda hemocyanins. *Biochemistry*. 25: 931-939.
- Herskovits, T. T.; Hamilton, M. G.; & Mazzella, L. J. (1986). Hemocyanin of the chiton, *Acanthopleura granulata*. *Biochemistry*. 25: 3612-3619.
- Herskovits, T. T.; & Hamilton, M. G. (1987a). Physical investigations of the hemocyanin of the chiton, *Cryptochiton stelleri* (Middendorff). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 86B: 641-649.
- Herskovits, T. T.; & Hamilton, M. G. (1987b). Hemocyanin of the chiton, *Stenoplax conspicua* (Dall). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 88B: 127-132.
- Himansh, K.; Taro, K.; & Shizuo, A. (2009). Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochemical Journal*. 420: 1–16.
- Holde, K. E.; Miller, K.I.; & Decker, H. (2001). Hemocyanins and invertebrate evolution. *The Journal of Biological Chemistry*. 276(19): 15563-66.
- Horn, T.; & Boutros, M. (2010). E-RNAi: a web application for the multi-species design of RNAi reagents--2010 update. *Nucleic Acids Research*. 38: 332-339.
- Hose, J. E.; & Martin, G. G. (1989). Defense functions of granulocytes in the ridgeback prawn *Sicyonia ingentis*. *The Journal of Invertebrate Pathology*. 53: 335–46.
- Hultmark, D. (2003). Drosophila immunity: paths and patterns. *Current Opinion in Immunology*. 15: 12-19.
- Iwanaga, S; & Lee, B.L. (2005). Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 38: 128–150.
- Iwasaki, A.; & Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology*. 5: 987–995.
- Jaenicke, E.; Föll, R.; & Decker, H. (1999). Spider Hemocyanin Binds Ecdysone and 20-OH-Ecdysone. *Journal of biological chemistry*. 34267-34271.
- Jessica, K. B.; et al. (2003). Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *TRENDS in Immunology*. 24: 528-533.
- Johansson, M. W.; & Söderhäll, K. (1989). Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. *Parasit Today*. 5: 171-176.

- Joop, A.J.; et al. (2007). Molecular cloning and expression of a Toll receptor in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*. 23: 504-513.
- Kenneth, J. L.; & Thomas D. S. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Analysis of real-time PCR data* 25: 402-408.
- Khayat, M.; et al. (1995) In vivo, in vitro and cell-free synthesis of hemocyanin in the shrimp *Penaeus semisulcatus* (de Haan). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 112: 31-38.
- Knaap, W. V. D. (1993). Defence in Invertebrate in Biotol (biotechnology by open learn). pp 215. Oxford: Butterworth-Heinman.
- Kondo, M.; et al. (1998). Ultrastructural and cytochemical characteristics of phagocytes in kuruma prawn. *Fish Pathology Journal*. 33: 421-427.
- Kumari, S.; Pramod, K. S.; & Nitin, K. (2010). Imidazole and its biological activities: A review. *Der Chemica Sinica*. 1 (3): 36-47.
- Kurtz, D. M. (1999) Oxygen-carrying proteins: three solutions to a common problem. *Essays in Biochemistry*. 34: 85-100.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Lee, S. Y.; Wang, R.; & Söderhäll, K. (2000). A lipopolysaccharide- and β -1,3-glucan-binding protein from hemocytes of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* purification, characterization, and cDNA cloning. *Journal of Biological Chemistry*. 275: 1337-1343.
- Lee, S. Y.; Lee, B. L.; & Söderhäll, K. (2003) Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Biological Chemistry*. 278(10): 7927-33.
- Lee, S. Y.; Lee, B. L.; & Söderhäll, K. (2004) Processing of crayfish hemocyanin subunits into phenoloxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 322: 490-496.
- Lei, K.; et al. (2007) Difference between hemocyanin subunits from *Penaeus japonicas* in anti-WSSV defense. *Developmental and Comparative Immunology*. 32: 808-813.
- Lemaitre, B.; et al. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 86: 973-983.

- Lemaitre, B.; et al. (1997). *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *the proceedings of the national academy of sciences USA*. 94: 14614-14619.
- Lieb, B.; et al. (2001). Structures of two molluscan hemocyanin genes: Significance for gene evolution. *the proceedings of the national academy of sciences USA*. 98: 4546-4551.
- Linzen, B.; et al. (1985) The structures of arthropod hemocyanins. *Science*. 299: 519-524.
- Lu, K. Y.; et al. (2006) Cloning the prophenoloxidase cDNA and monitoring the expression of proPO mRNA in prawns (*Macrobrachium rosenbergii*) stimulated *in vivo* by CpG oligodeoxynucleotides. *Fish & Shellfish Immunology*. 20: 274-284.
- Luna, C.; et al. (2003). Characterization of three Toll-like genes from mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*. 12: 67–74.
- Luo, T.; et al. (2006). Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology*. 30: 607–617.
- Markl, J. (1980). Hemocyanin in spider XI. The quarternary structures of *Cupiennius* hemocyanin. *Journal of Comparative Physiology*. 140B: 199-207.
- Markl, J. (1986). Evolution and function of structurally diverse subunits in the respiratory protein hemocyanin from arthropods. *Biological Bulletin*. 171: 90-115.
- Markl, J.; & Decker, H. (1992). *Molecular structure of the arthropod hemocyanins*. In: *Advances in Comparative and Environmental Physiology. Blood and tissue oxygen carriers*. In: Mangum, C.P. Editors. Springer Press, Vol. 13, p. 325-376. Heidelberg, Germany.
- Mary, B. B. M.; & Maria, V. R. T. (2015). Biotechnological Advances in Shrimp Health Management in the Philippines. 123-134 ISBN: 978-81-308-0558-0.
- Mekata, T.; et al. (2008). Identification of cDNA encoding Toll receptor, *MjToll* gene from kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Fish & Shellfish Immunology*. 24: 122–133.
- Michael, B. N. (2002). Farming freshwater prawns. A manual for the culture of the giant river prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Marlow.
- Miller, K.; et al. (1998) Sequence of the *Octopus dofleini* hemocyanin subunit: structural and evolutionary implications. *Journal of Molecular Biology*. 278: 827-842.

- Nagai, T.; Osaki, T.; & Kawabata, S. (2001) Functional conversion of hemocyanin to phenoloxidase by horseshoe crab antimicrobial peptides. *Journal of Biological Chemistry*. 276: 27166-27170.
- Neuteboom, B.; Jekel, P. A.; & Beintema, J. J. (1992) Primary structure of hemocyanin subunit c from *Panulirus interruptus*. *Eur. Journal of Biochemistry*. 206: 243-249.
- New M.B. (2010) History and global status of freshwater prawn farming. In: Freshwater Prawns Biology and Farming. (ed. by M.B. New, W.C. Valenti, J.H. Tidwell, L.R. D'Abramo & M.N. Kutty), pp. 1–11. Wiley-Blackwell, West Sussex.
- Nicholas, J. G.; Monique, G.; & Alexander, N. R. W. (2006). Toll-like receptors as molecular switches. *Nature Reviews Immunology*. 6: 693-698.
- Ohnishi, T.; Muroi, M.; & Tanamoto, K. (2003). MD-2 is necessary for the Toll-like receptor 4 protein to undergo glycosylation essential for its translocation to the cell surface. *Clinical and Vaccine Immunology*. 10: 405-10.
- Pan, D.; et al. (2005) Differential gene expression profile in hepatopancreas of WSSV-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by suppression subtractive hybridization. *Developmental and Comparative Immunology*. 29: 103–112.
- Payattikul, P.; et. al. (2015). Development of a PCR Assay Based on a Single-Base Pair Substitution for the Detection of *Aeromonas caviae* by Targeting the gyrB Gene. *Journal of Aquatic Animal Health*. 27(3): 164-171.
- Phelan, P. E.; Mellon, M. T.; & Kim, C. H. (2005). Functional characterization of full-length TLR3, IRAK-4, and TRAF6 in zebrafish (*Danio rerio*). *Molecular Immunology*. 42: 1057-71.
- Pless, D. D.; et al. (2003) Latent phenoloxidase activity and N-terminal amino acid sequence of hemocyanin from *Bathynomus giganteus*, a primitive crustacean. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 409: 402-410
- Rainer , J.; & Brouwer, M. (1993) Hemocyanin synthesis in the blue crab *Callinectes sapidus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 104B: 69-73
- Rao, M. S.; et al. (2007) Changes of copper and protein profiles in hepatopancreas and hemolymph tissues during difference molt stages of white shrimp, *Litopenaeus vanamei* (Boone, 1931). *Biotechnology*. 7: 153-156.
- Ratcliffe, N. A.; et al. (1985). Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. *International Review of Cytology*. 97: 183-350.

- Rattanarojpong, T.; et al. (2007). Analysis of differently expressed proteins and transcripts in gills of *Penaeus vannamei* after yellow head virus infection. *Proteomics*. 7: 3809–3814.
- Ravi, M.; et al. (2010). Clearance of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) and immunological changes in experimentally injected *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish & Shellfish Immunology*. 28: 428-433.
- Rock, F. L.; et al. (1998). A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *the proceedings of the national academy of sciences USA*. 95: 588–593.
- Romo-Figueroa M. G.; et al. (2004). Molecular cloning of a β -glucan pattern-recognition lipoprotein from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus vannamei)*: correlation between the deduced. *Developmental and Comparative Immunology*. 28: 713-726
- Roux, M. M.; et al. (2002). The Lipopolysaccharide and β -1,3-Glucan Binding Protein Gene Is Upregulated in White Spot Virus-Infected Shrimp (*Penaeus stylirostris*). *Journal of virology*. 17: 7140–7149.
- Salvato, B.; & Beltramini, M. (1990) Hemocyanins: Molecular architecture, structure and reactivity of the binuclear copper site. *Life Chemistry Reports*. 8: 1-47.
- Salvato, B.; et al. (1998). The enzymatic properties of *Octopus vulgaris* hemocyanin: Odiphenol oxidase activity. *Biochemistry*. 37: 14065-14077.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; & Maniatis, T. (2000). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Third Edition). New York.
- Sambrook, J.; & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: Cold spring Harbor laboratory Press* (Third Edition). New York.
- Sanders, N. K.; et al. (1992) Effects of ammonia, trimethylamine, L-lactate and CO₂ on some decapod crustacean haemocyanins. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 101A: 511-516.
- Sarathi, M.; et al. (2008). Clearance of white spot syndrome virus (WSSV) and immunological changes in experimentally WSSV-injected *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol*. 25(3): 222-230.
- Schneider, H. J.; et al (1986). Partial amino acid sequence of crayfish (*Astacus leptodactylus*) hemocyanin. In: *Invertebrate Oxygen Carriers*, Linzen, B., Ed. Springer Press, Heidelberg, Germany, pp 173-176.
- Sellos, D.; Lemoine, S.; & Wormhoudt, A. V. (1997). Molecular cloning of hemocyanin cDNA from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): Structure, evolution and physiological aspects. *FEBS Letters*. 407: 153-158.

- Senapin, S.; et al. (2007). Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. *Aquaculture*. 266: 32-38.
- Söderhäll, K. (1982). Prophenoloxidase activating system and melanization - a recognition mechanism of arthropods? A review. *Developmental and Comparative Immunology*. 6: 601-611.
- Söderhäll, K.; & Cerenius, L. (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology*. 10: 23-28.
- Somboonwiwat, K.; et al. (2005). Recombinant expression and anti-microbial activity of anti-lipopolysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology*. 29: 841-851.
- Somboonwiwat, K.; et al. (2010). A. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in *Penaeus monodon* hemocytes after *Vibrio harveyi* infection. *Proteome Science*. 8(1): 39-50.
- Spindler, K. D.; Hennecke, R. G.; & Gellissen, G. (1992). Protein production and the molting cycle in the crayfish *Astacus leptodactylus* (Nordmann, 1842). II. Hemocyanin and protein synthesis in the midgut gland. *General and Comparative Endocrinology*. 85: 248-253.
- Sritunyalucksana, K.; Lee, S. Y.; & Söderhäll, K. (2002). The beta-1,3-glucan binding protein from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Development and Comparative Immunology*. 26(3): 237-245.
- Stoeva, S.; et al. (2001). *Penaeus monodon* (tiger shrimp) hemocyanin: subunit composition and thermostability. *Z. Naturforsch.* 56: 416-422.
- Sung, H. H.; Hwang, S. F.; & Tasi, F. M. (2000). Responses of giant fresh water prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) to challenge by two strains of *Aeromonas* spp. *Journal of Invertebrate Pathology*. 76: 278-84.
- Tamura, K.; et al. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. 10: 2731-2739.
- Terwilliger, N. B.; & Brown, A. C. (1993). Ontogeny of hemocyanin function in the Dungeness crab *Cancer magister*: The interactive effects of developmental stage and divalent cations on hemocyanin oxygenation properties. *Journal of Experimental Biology*. 183: 1-13.

- Thornqvist, P. O.; Johansson, M. W.; & Söderhäll, K. (1994). Opsonic activity of cell adhesion proteins and β -1,3-glucan binding proteins from two crustaceans. *Developmental and Comparative Immunology*. 18: 3-12.
- Uthairat, N.N; & Orapint J. 2012 REVIEW ARTICLE Current status & prospects of farming the giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man 1879) in Thailand. *Aquaculture Research*. 43: 1015–1022.
- Valanne, S.; Wang, J. H.; & Rämet, M. (2011). The *Drosophila* Toll signaling pathway. *Journal of Immunology*. 186: 649-56.
- Van Holde, K. E.; & Miller, K. I. (1995). *Hemocyanins*. In *Advances in Protein Chemistry*. In: Anfinsen, C. B.; Edsall, J. T.; Eiseberg D. S.; & Richards, F. M. Editors. *Academic Press Inc.*, Vol. 47, p. 1-81. New York.
- Van Holde, K.; Miller, K.; & Decker, H. (2001) Hemocyanins and invertebrate evolution. *Journal of Biological Chemistry*. 276: 15563-15566.
- Vazquez, L.; et al. (1993). Purification and characterization of a lectin from *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea, Decapoda) hemolymph. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 105: 617-623.
- Volbeda, A.; & Hol, W. G. (1989) Crystal structure of hexameric haemocyanin from *Panulirus interruptus* refined at 3.2 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. 209: 249-379.
- Wang, T.; Lafuse, W. P.; & Zwilling, B. S. (2001). NF κ B and Sp1 elements are necessary for maximal transcription of Toll-like receptor 2 induced by *Mycobacterium avium*. *Journal of Immunology*. 167: 6924-32.
- Wang, Y. C.; Chang, P. S.; & Chen, H. Y. (2007). Tissue expressions of nine genes important to immune defence of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish shellfish immunology*. 23(6): 1161-77.
- Wang, K. C. H. C.; et al. (2010). RNAi knock-down of the *Litopenaeus vannamei* Toll gene (*LvToll*) significantly increases mortality and reduces bacterial clearance after challenge with *Vibrio harveyi*. *Developmental and Comparative Immunology*. 34: 49-58.
- Wang, P. H.; et al. (2012). Molecular cloning, characterization and expression analysis of two novel Tolls (*LvToll2* and *LvToll3*) and three putative Spätzle-like Toll ligands

- (LvSpz1-3) from *Litopenaeus vannamei*. *Developmental and Comparative Immunology*. 36(2): 359-371.
- Wang, W.; et al. (2012). Cloning and characterization of the hemocyanin gene of prawn *Macrobrachium nipponense*. *Turkish Journal of Biochemistry*. 37(4): 348–355.
- Wangman, P.; et al. (2012). Production of monoclonal antibodies specific to *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus using recombinant capsid protein. *Diseases of Aquatic Organisms*. 20;98(2):121-31.
- Weber, A. N. R.; Morse, M.A.; & Gay, N. J. (2004). Four N-linked glycosylation sites in human Toll-like receptor 2 cooperate to direct efficient biosynthesis and secretion. *Journal of Biological Chemistry*. 279: 34589-94.
- Xi, Z.; Ramirez, J. L.; Dimopoulos, G. (2008) The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathol* 4:e1000098
- Xu, Y.; et al. (2000). Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature*. 408: 111-115.
- Yang, L. S.; et al. (2007). A Toll receptor in shrimp. *Molecular Immunology*. 44: 1999–2008.
- Yang, C.; et al. (2008). A Toll receptor from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* is responsive to *Vibrio anguillarum* infection. *Fish & Shellfish Immunology*. 24: 564–574.
- Yannick, L.; et al. (2009). Lack of evidence for *Litopenaeus vannamei* Toll receptor (*IToll*) involvement in activation of sequence-independent antiviral immunity in shrimp. *Developmental and Comparative Immunology*. 33: 806–810.
- Ying, M. C.; et al. (2010). Comparative proteomic profiles of the hepatopancreas in *Fenneropenaeus chinensis* response to white spot syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology*. 29 : 480-486.
- Zhang, X.; Huang, C.; & Qin, Q. (2004). Antiviral properties of hemocyanin isolated from shrimp *Penaeus monodon*. *Antiviral Research*. 61:93–99.
- Zhang, Y. L.; et al. (2006). Affinity proteomic approach for identification of an IgA-like protein in *Litopenaeus vannamei* and study on its agglutination characterization. *Journal of Proteome Research*. 5:815–21.
- Zhao, X.; et al. (2012). SNPs of hemocyanin C-terminal fragment in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *FEBS Letters*. 586(4):403-10.
- Zhuang, J.; et al. (2015). Identification of candidate antimicrobial peptides derived from abalone hemocyanin. *Developmental and Comparative Immunology*. 49: 96 – 102.

ภาคผนวก



ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. LB broth

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast-extract	2.5	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	500.0	มิลลิลิตร

2. LB agar

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast-extract	2.5	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Agar	7.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	500.0	มิลลิลิตร

3. Tryptic soy agar

trypticase soy broth (Himedia)	30.0	กรัม
Granulated agar	15.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1000.0	มิลลิลิตร

4. Alkaline Peptone Water (APW), pH 9.2

Peptone	10.0	กรัม
NaCl	10.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1000.0	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข
บัฟเฟอร์และสารเคมี

1. 10X TBE buffer

Tris-HCl (ปรับ pH 8.3)	108.0	กรัม
Boric acid	55.0	กรัม
EDTA	9.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1000.0	มิลลิลิตร

2. 0.15M Phosphate buffered saline (2XPBS), pH 7.2

NaCl	8.00	กรัม
KCl	0.20	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.20	กรัม
Na ₂ HPO ₄	1.15	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	500.00	มิลลิลิตร

ประวัติย่อผู้วิจัย



ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวชุตินา ศรีสุข
วันเดือนปีเกิด	28 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2527
สถานที่เกิด	กรุงเทพฯ
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	33/503 ซ.โชคชัย 4 ถ.ลาดพร้าว เขตลาดพร้าว กรุงเทพฯ 10230
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2544	มัธยมศึกษาปีที่ 6 จาก โรงเรียนนวมินทราชินูทิศสตรีวิทยา ๒
พ.ศ. 2548	วท.บ. (จุลชีววิทยา) จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
พ.ศ. 2550	วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
พ.ศ. 2558	ปร.ด. (เทคโนโลยีชีวภาพ) จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ