รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

โครงการต่อเนื่องระยะเวลา 2 ปี

ประจำปีงบประมาณ 2552-2553

ชีวโมเลกุลเพื่อป้องกันโรคกุ้ง

(Biomolecules: for prevention of diseases in shrimp)

ศ.ดร. อมรรัตน์ พงศ์ดารา

ผู้อำนวยการชุดโครงการวิจัย

หน่วยงานต้นสังกัด สถานวิจัยจีโนมและชีวสารสนเทศ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Abstract

This project compose of four parts; part I, The WBP showed binding with VP26 (22 kDa) envelope structural protein of WSSV by western blotting. As WBP had the ability to bind with VP26, so WBP was assayed for neutralizing activity of the WSSV. *In vitro* neutralization assay was tested with various quantities of WBP that preincubated with WSSV and then the mixtures were incubated with the hemocytes. Preincubation with increasing amounts of WBP resulted in decreasing numbers of WSSV particles were recovered from the hemocytes. Especially, the WSSV that was neutralized by WBP at 80 mg. The numbers of WSSV particles recovered from the hemocytes was $6.0x10^{2}$ copies while those of WSSV without treated by WBP (positive control) was $2.0x10^{7}$ copies. In addition, *In vivo* neutralization assay was investigated with WBP at different concentrations and then injected intramuscularly to the white shrimp (*Penaeus vannamie*). Fifteen days after injection, the result showed that the neutralization of WSSV with 80 μg of WBP gave 89% relative percentage survival. These results demonstrated that WBP was effective in neutralization the virulence of WSSV and WBP was stable at room temperature for 24 hours.

Part II, The possibility of using rFBP1 to protect against virus infection was tested. Injection of shrimp with rFBP1 that produced from bacteria, after infection with WSSV, resulted in 80 % survival and after infection with YHV, resulted no survival shrimp. This result implies that injection of recombinant rFBP1 decreases WSSV viral infection by an unknown mechanism and can't protect against YHV viral infection same rFortilin. Furthermore, rFBP1 that produced from yeast was mixed with the shrimp food (oral administration) for used to protect shrimp from the WSSV infection, but the result was unclear to against virus infection. Further investigate on the FBP1 molecular mechanism using dsRNA, the result show FBP1 level was non-specific decreased.

Part III, The full length Pm-RACK1 cDNA has 957 bp, and an open reading frame encoding a protein of 318 amino acid residues. The protein contains seven WD40 repeats and shares approximately 78% identity with vertebrate RACK1. In adult shrimp, Pm-RACK1 transcripts were detected in all tissues. During WSSV infection, Pm-RACK1 was upregulated in hepatopancreas, stomach and hemocytes. We identified Pm-RACK1 as a specific cellular target protein for VP9, a nonstructural protein of WSSV. The interaction of these two proteins may be involved in mediating intracellular VP9 functions.

Part IV, The *14-3-3ε* mRNAs were identified from the shrimp *Litopenaeus vannamei*. The open reading frame is 774 bp in length, encoding a deduced amino acid sequence of 257 residues. The *14-3-3* transcript variants were constitutively expressed in all shrimp tissues tested. The high expression was found in lymphoid. However, the expression level of the *14-3-3ε* transcript changed after white spot syndrome virus (WSSV) infaction. At 48 h after infaction, the expression of *14-3-3ε* mRNA was increased significantly in muscle tissue but in the lymphoid organ, it was a significant down-expression. The investigation of the interaction between 14-3-3ε and caspase-3 *in vitro* resulted in 14-3-3ε isoforms weren't cleaved by caspase-3. From these results we suggest that 14-3-3ε might play an important role during WSSV infaction in partially caspase-independent manner.

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยชุดนี้ประกอบด้วย 4 ส่วนโครงการย่อย ในส่วนที่ 1 โปรตีน WBP สามารถจับได้อย่างจำเพาะกับโปรตีน VP26 ของไวรัสตัวแดงดวงขาวซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 22 กิโลดาลตัน โดยโปรตีนดังกล่าวจัดเป็นโปรตีนในกลุ่มที่มีคุณสมบัติเกี่ยวกับโครงสร้าง (Structural protein) และมีตำแหน่งอยู่บนเปลือกหุ้มของอนุภาคไวรัส (Envelope) ที่เชื่อว่าไวรัสจะอาศัยโปรตีนในกลุ่มดังกล่าวเป็นส่วนสำคัญในการยึดเกาะและเชื่อมต่อกับผนังเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้าน ดังนั้นการที่พบว่าโปรตีน WBP สามารถจับได้อย่างจำเพาะกับโปรตีน VP26 ในการศึกษาครั้งนี้จึงนำโปรตีน WBP มาทดสอบความสามารถในการลบล้างฤทธิ์ของไวรัส ในรูปแบบของ *In vitro* ซึ่งผลจากการทดลองพบว่าเมื่อนำโปรตีน WBP ปริมาณต่างๆ มาบ่มกับไวรัสตัวแดงดวงขาว แล้วนำสารละลายผสมดังกล่าวมาบ่มกับเซลล์เม็ดเลือด พบว่าโปรตีน WBP สามารถลบล้างฤทธิ์ของไวรัส ตัวแดงดวงขาวและส่งผลให้จำนวนของไวรัสที่สามารถเกาะและยึดจับกับเซลล์เม็ดเลือดมีจำนวนของไวรัสลดลงตามปริมาณของโปรตีน WBP ที่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้โปรตีน WBP ที่ปริมาณ 80 ไมโครกรัม สามารถลบล้างฤทธิ์ของไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ดีที่สุด ซึ่งทำให้จำนวนของไวรัสลดลงเหลือเท่ากับ $6.0x10^2$ copies เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เป็น positive control ซึ่งมีจำนวนของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่สามารถเกาะกับเซลล์เม็ดเลือดได้เท่ากับ $2.0x10^7$ copies การศึกษาในขั้นต่อมาเป็นการทดสอบความสามารถในการลบล้างฤทธิ์ไวรัสตัวแดงดวงขาวของโปรตีน WBP ในรูปแบบ *in vivo* โดยการนำโปรตีน WBP ที่ปริมาณต่างๆมาบ่มกับไวรัสตัวแดงดวงขาวแล้วนำไปฉีดในกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) ซึ่งเมื่อเวลาผ่านไป 15 วัน พบว่าโปรตีน WBP ที่ปริมาณ 80 ไมโครกรัม สามารถลบล้างฤทธิ์ของไวรัสตัวแดงดวงขาวแล้วทำให้กุ้งมีอัตราการมีชีวิตรอดมากที่สุด คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของค่า RPS (Relative percentage survival) เท่ากับ 89% ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าโปรตีน WBP เป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการลบล้างฤทธิ์ไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยสามารถคงทนและรักษาประสิทธิภาพในการลบล้างฤทธิ์ไว้นาน 24 ชั่วโมง เมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ส่วนที่ 2: ศึกษาความเป็นไปได้ของโปรตีน FBP1 ในการป้องกันกุ้งจากการติดเชื้อไวรัสโดยทำการทดลองโดยเตรียมโปรตีนลูกผสม FBP1 จากแบคทีเรียและยีสต์แล้วทดสอบประสิทธิภาพการป้องกันไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งขาว *P. vannamei* พบว่าการฉีดโปรตีน FBP1 ที่ผลิตจากแบคทีเรียสามารถช่วยลดปริมาณการตายเมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้รับโปรตีน โดยกุ้งมีอัตรารอดอยู่ที่ 80% ส่วนการทดสอบฤทธิ์กับไวรัสอื่น เช่น ไวรัสหัวเหลือง ก็พบว่าไม่สามารถใช้ในการป้องกันไวรัสหัวเหลือง ปรากฏการณ์เดียวกันนี้ก็เกิดขึ้นกับ Pm-fortilin ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์กัน และเมื่อนำยีสต์ที่ผลิต FBP1 ไปผสมอาหารเลี้ยงกุ้งก่อนและหลังทำให้กุ้งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว แล้วตรวจสอบอัตราการรอด เปรียบเทียบกับกุ้งที่ไม่ได้รับ FBP1 ผลการทดสอบยังไม่ชัดเจนว่า FBP1 จากยีสต์สามารถลดอัตราการตายหรือไม่ นอกจากนี้ด้านการใช้ dsRNA เพื่อศึกษากลไกระดับโมเลกุลของ FBP1 ก็พบว่าด้วยวิธีการที่ใช้ในครั้งนี้ FBP1 ถูกลดปริมาณลงอย่างไม่จำเพาะ

ส่วนที่ 3: *Pm-RACK1* ประกอบด้วย 957 คู่เบส แปลได้เป็น 318 ลำดับกรดอะมิโน RACK1 เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยโดเมน WD40 ซ้ำกัน 7 ส่วน และมีความคล้ายกับ RACK1 ของสิ่งมีชีวิตชั้นสูงถึงประมาณ 78% โดยในกุ้งโตเต็มวัย พบการแสดงออกของยีน Pm-RACK1 ในทุกอวัยวะของกุ้ง แต่ระหว่างที่กุ้งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว การแสดงออกของยีนเพิ่มสูงขึ้นในส่วน hepatopancrease, stomach และ hemocytes ของกุ้ง นอกจากนี้ยังพบว่า Pm-RACK1 มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน VP9 ของไวรัสตัวแดงดวงขาว ซึ่ง Pm-RACK1 อาจจะเป็นตัวกลางที่เกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ของ VP9 ในกุ้งกุลาดำ

ส่วนที่ 4: พบยีน *14-3-3Ɛ* จากกุ้งขาว *(Litopenaeus vannamei)* มีขนาด 774 คู่เบส เมื่อแปลเป็นกรดอะมิโนได้ 257 ตัว ในกุ้งขาวปกตินั้นพบการแสดงออกของยีน*14-3-3Ɛ* ในทุกเนื้อเยื่อที่นำมาทดสอบ โดย*14-3-3Ɛ* มีการแสดงออกสูงในลิมฟอยด์อย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีน*14-3-3Ɛ* มีการเปลี่ยนแปลงภายหลังจากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยพบว่าหลังจากกุ้งเกิดการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ 48 ชั่วโมง ยีน *14-3-3Ɛ* มีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นในกล้ามเนื้อ ตรงข้ามกับลิมฟอยด์ที่พบการแสดงออกของยีนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนทั้งสองในหลอดทดลอง พบว่าโปรตีน 14-3-3Ɛ และโปรตีน caspase-3 ไม่มีปฏิสัมพันธ์กัน ดังนั้นจากการศึกษาในครั้งนี้จึงคาดว่าโปรตีน 14-3-3Ɛ มีบทบาทสำคัญในระหว่างการติดเชื้อไวรัสที่ไม่เกี่ยวข้องกับวิถีที่มีโปรตีน caspase เป็นตัวกลาง