



การโคลนและศึกษาสมบัติของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนจากกุ้งขาว  
Cloning and Characterization of Fibrinogen-Related Protein Gene  
from White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

วิลัยลักษณ์ เกลี้ยงคำหมอ  
Wilailuck Klengkommor

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of  
Master of Science in Biochemistry  
Prince of Songkla University

2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์    การโคลนและศึกษาสมบัติของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟโบรีโนเจนจากกุ้งขาว  
 ผู้เขียน            นางสาววิไลลักษณ์ เกลี้ยงคำหอม  
 สาขาวิชา          ชีวเคมี

---

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....

.....ประธานกรรมการ

(ดร.อรณิชา รัตนภรณ์)

(รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทาร์พันธุ์)

.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล)

.....กรรมการ

(ดร.อรณิชา รัตนภรณ์)

.....กรรมการ

(ดร.จงรักษ์ อรรถรัฐ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับ  
 เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

.....  
 (รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ดร.อรณิชา รัตนภรณ์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(นางสาววิไลลักษณ์ เกียรติคำหอม)

นักศึกษา

(4)

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน  
และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาววิไลลักษณ์ เกลี้ยงคำหอม)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การโคลนและศึกษาสมบัติของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนจาก กุ้งขาว
ผู้เขียน	นางสาววิไลลักษณ์ เกลี้ยงคำหมอ
สาขาวิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2556

### บทคัดย่อ

โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจน (fibrinogen-related protein, FReP) เป็น pattern recognition protein (PRP) ชนิดหนึ่งที่มีโดเมนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจน (fibrinogen-related domain, FReD) อยู่ในโครงสร้าง โปรตีนหลายชนิดในกลุ่มนี้มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด งานวิทยานิพนธ์นี้ผู้วิจัยได้ทำการโคลน cDNA ของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนจากตับของกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* (LvFReP) โดยเทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) และ rapid amplification of cDNA ends (RACE) ผลการศึกษาสามารถโคลน cDNA บางส่วนของยีนที่มีความยาว 979 คู่เบส ประกอบด้วยส่วนที่แปลรหัสเป็นสายโพลีเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 255 หน่วย ภายในโครงสร้างของโปรตีนพบโดเมนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจน 1 โดเมน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 219 หน่วย และมีส่วน signal sequence มีมวลโมเลกุลและค่า pI เท่ากับ 29.24 กิโลดาลตัน และ 6.29 ตามลำดับ มีตำแหน่ง N-glycosylation 1 ตำแหน่ง มีบริเวณจับกับ  $Ca^{2+}$  1 ตำแหน่ง และมีบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนซิสเตอีน 4 ตำแหน่ง ซึ่งสามารถสร้างเป็นพันธะไดซัลไฟด์ได้ 2 พันธะ เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโดเมนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนของ LvFReP พบว่ามีความเหมือนกับโดเมนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนของ FReP จากกุ้งแชบ๊วย (*Fenneropenaeus merguensis*, tachylectin-5A (TL-5A) และ tachylectin-5B (TL-5B) จากแมงดาทะเล คือ 98%, 48% และ 47% ตามลำดับ จากการศึกษาการแสดงออกของยีน LvFReP พบว่ามีการแสดงออกในหลายเนื้อเยื่อของกุ้งปกติ นอกจากนี้งานวิทยานิพนธ์นี้ยังได้ศึกษาการแสดงออกของยีน LvFReP จากตับของกุ้งขาว ที่เวลาต่าง ๆ หลังจากกระตุ้นด้วย white spot syndrome virus (WSSV) ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR พบว่าระดับ mRNA ของ LvFReP เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และมีระดับการแสดงออกสูงสุดในชั่วโมงที่ 3 ซึ่งมีการ

(6)

แสดงออกเพิ่มขึ้น 2.04 เท่า หลังการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ WSSV หลังจากนั้นระดับการแสดงออกของ LvFReP จะลดลงที่ชั่วโมงที่ 6 แล้วจะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอีกครั้งในชั่วโมงที่ 12 หลังการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อก่อโรค จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนจากกุ้งขาว อาจจะทำหน้าที่เป็น pattern recognition protein ในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง

<b>Thesis Title</b>	Cloning and Characterization of Fibrinogen-Related Protein Gene from White Shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> )
<b>Author</b>	Miss Wilailuck Klengkommor
<b>Major Program</b>	Biochemistry
<b>Academic Year</b>	2013

### ABSTRACT

Fibrinogen-related proteins (FRePs) are a kind of pattern recognition proteins (PRPs) containing fibrinogen-related domain (FReD). Many members of this family play important roles in the innate immune responses. In the present study, the cDNA of white shrimp *Litopenaeus vannamei* FReP (designated as LvFReP) was partially cloned from hepatopancreas by means of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE) method. As a result, the partial cDNA of LvFReP (979 bp) consisted of an open reading frame that encoded a polypeptide of 255 amino acids including a 219 amino acid FReD and a signal sequence. The theoretical molecular weight and isoelectric point of mature protein was 29.24 kDa and 6.29, respectively. It also comprises a putative N-glycosylation site, Ca<sup>2+</sup> binding site and four conserved cysteines which are formed to two disulfide bonds. Sequence comparison of FReD of LvFReP showed identity of 98%, 48%, and 47% with that of FReP from *Fenneropenaeus merguensis* (FmFReP), techylectin-5A (TL-5A) and techylectin-5B (TL-5B) from horseshoe crab, respectively. LvFReP was detected in various tissues of normal shrimp. Moreover, the temporal expression of LvFReP mRNA in the hepatopancreas was examined by semi-quantitative RT-PCR. Its mRNA expression after challenging with white spot syndrome virus (WSSV) was significantly up-regulated and peaked to 2.04-fold at 3 h after stimulation. After that, the expression level decreased at 6 h and reversely increased at 12 h after pathogenic challenging. These results collectively suggested that FReP of white shrimp may act as a pattern-recognition protein in the immune response of shrimp.

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ด้วยความเสียสละเวลา กรุณาให้คำแนะนำแนวทางแก้ปัญหาข้อบกพร่องต่าง ๆ การให้ความรู้ข้อชี้แนะในด้านข้อมูลการวางแผนงานวิจัยและเทคนิคการวิจัย ตลอดจนเสียสละเวลาให้คำปรึกษาและตรวจทานแก้ไขงานวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี จากอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.อรณิชา รัตนภรณ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทาร์พันธุ์ ประธานกรรมสอบที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์ ตลอดจนให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการ เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล และ ดร.จรงค์ อรรถรัฐ กรรมการผู้แทนจากบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้ให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนวิจัย และขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนการศึกษาระดับปริญญาโท จากโครงการความเป็นเลิศสาขาชีวเคมี ประจำปี 2555

ขอขอบคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมีทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการศึกษาและวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำที่อนุเคราะห์เชื้อก่อโรค และขอขอบคุณคุณเบญจพร ภูเพชร ที่ช่วยสอนเทคนิคและงานวิจัยบางส่วน ตลอดจนขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ ห้องปฏิบัติการ วท. 414 และ วท. 418 ทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจ ช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการทำวิจัยจนเสร็จสมบูรณ์

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่อบรมสั่งสอนให้ความรัก ความห่วงใยเป็นกำลังใจที่สำคัญและอยู่เคียงข้างเสมอมา อีกทั้งสนับสนุนทุนการศึกษาและให้โอกาสทางการศึกษาที่ดีเสมอมา ผลสำเร็จและสิ่งที่เป็นประโยชน์ของงานวิจัยชิ้นนี้ ขออุทิศแด่ผู้มีพระคุณที่กล่าวถึงทุกท่านและสัตว์ทดลองทุกชนิด

วิสัยลักษณ์ เกลี้ยงคำหมอ



## สารบัญ

สารบัญ	หน้า
รายการตาราง	(10)
รายการรูป	(11)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(13)
บทที่ 1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	6
วัตถุประสงค์	30
บทที่ 2 วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	31
วัสดุ	31
อุปกรณ์	33
วิธีการ	34
บทที่ 3 ผลการทดลอง	53
บทที่ 4 วิจัยารณ์ผลการทดลอง	68
บทที่ 5 สรุป	75
เอกสารอ้างอิง	77
ภาคผนวก	88
ประวัติผู้เขียน	90

## รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชนิดของเลคตินที่มีรายงานในกึ่งชนิดต่าง ๆ	18
2	คุณลักษณะของเลคตินชนิดต่าง ๆ ในกึ่งสกุลพีเนียส 5 ชนิด	23
3	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการโคลน DNA ชั้นกลาง ของยีน LvFReP	36
4	สารละลายที่ใช้ในการทำ PCR ของ cDNA ชั้นกลาง	36
5	อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในการทำ PCR ของ cDNA ชั้นกลาง	37
6	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณ DNA ด้านปลาย 3'	44
7	สารละลายที่ใช้ในการทำ PCR ด้านปลาย 3' (รอบที่ 1)	44
8	อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในการทำ PCR ด้านปลาย 3' (รอบที่ 1)	45
9	สารละลายที่ใช้ในการทำ PCR ด้านปลาย 3' (รอบที่ 2) และด้านปลาย 3' Nested	45
10	อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในการทำ PCR ด้านปลาย 3' (รอบที่ 2) และด้านปลาย 3' Nested	46
11	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณ DNA ด้านปลาย 5'	47
12	สารละลายที่ใช้ในการทำ PCR ด้านปลาย 5' (รอบที่ 1)	47
13	อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในการทำ PCR ด้านปลาย 5' (รอบที่ 1)	48
14	สารละลายที่ใช้ในการทำ PCR ด้านปลาย 5' (รอบที่ 2) และด้านปลาย 5' Nested	48
15	อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในการทำ PCR ด้านปลาย 5' (รอบที่ 2) และด้านปลาย 5' Nested	49
16	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA ส่วน ORF ของยีน LvFReP	50
17	คุณสมบัติของยีนที่มีโดเมน FReD เป็นองค์ประกอบจากสัตว์ กลุ่มครัสเตเชียน	69
18	เปอร์เซ็นต์ความเหมือนของโดเมน FReD ของ LvFReP กับโดเมน FReD ของโปรตีนอื่น ๆ ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน	72

## รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	กุ้งขาว (white shrimp, <i>Litopenaeus vannamei</i> )	6
2	สัณฐานวิทยาของกุ้ง	7
3	วงจรชีวิตของกุ้งในกลุ่มพีเนียส	9
4	การจับของเลคตินกับเซลล์แปลกปลอมกระตุ้นการเกิด opsonization และ phagocytosis	11
5	โดเมนและโครงสร้างของ MBL	15
6	โดเมนและโครงสร้างของ Ficolin	16
7	โครงสร้างของเลคตินชนิดต่างๆ ที่พบในกุ้ง	19
8	ลักษณะดวงขาวใต้เปลือกของกุ้งที่เป็นโรคตัวแดงดวงขาว	28
9	ลักษณะผิวใต้เปลือกและอวัยวะสร้างเม็ดเลือดของกุ้งที่เป็นโรคตัวแดงดวงขาว	29
10	รูปร่างลักษณะของไวรัสโรคตัวแดงดวงขาว	29
11	แผนที่ลักษณะ DNA พาหะ pGEM <sup>®</sup> -T Easy	38
12	แผนภาพแสดงขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA สายแรก สำหรับการเพิ่มปริมาณ DNA ด้านปลาย 5' และ 3'	43
13	แบบแผนการโคลน DNA ของยีน LvFReP ของกุ้งขาว	54
14	แบบแผน DNA ชั้นกลางใน 1% agarose gel electrophoresis ของยีน LvFReP ที่ได้จากการทำ PCR	55
15	ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน LvFReP ของกุ้งขาว	56
16	เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน LvFReP ชั้นกลางของกุ้งขาว กับลำดับกรดอะมิโนของยีน FmFReP จากกุ้งแช่บ๊วย	56
17	โดเมนอนุรักษ์ (Fibrinogen-related domain) ของยีน LvFReP ของกุ้งขาว	56
18	แบบแผน DNA ใน 1% agarose gel electrophoresis ด้านปลาย 3' ของยีน LvFReP ที่ได้จากการทำ PCR	58
19	ลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 3' ของยีน LvFReP จากการทำให้ 3' RACE	58
20	แบบแผน DNA บริเวณ Open reading frame ของยีน LvFReP ใน 1% agarose gel electrophoresis ที่ได้จากการทำ PCR	60

## รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
21	ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน LvFReP จากกุ้งขาว	61
22	โดเมนของ LvFReP	62
23	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโดเมน FReD ของยีน LvFReP ของกุ้งขาวกับกุ้งหรือสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนชนิดอื่น ๆ	63
24	Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่างโดเมน FReD ของ LvFReP ของกุ้งขาวกับสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนชนิดต่าง ๆ	65
25	การแสดงออกของ mRNA ของยีน LvFReP ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ด้วยวิธี RT-PCR เปรียบเทียบกับ $\beta$ -actin ซึ่งใช้เป็นยีนควบคุม	66
26	อัตราส่วนความเข้มแถบของยีน LvFReP เทียบกับยีน $\beta$ -actin ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งขาว	66
27	ระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน LvFReP ในตับของกุ้งขาว หลังฉีดด้วยเชื้อ WSSV ณ ช่วงเวลาต่าง ๆ	67

### สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

°	=	องศาเซลเซียส
ซ	=	องศาเซลเซียส
A	=	Absorbance
bp	=	base pair
cDNA	=	complementary deoxyribonucleic acid
CRD	=	carbohydrate recognition domain
DEPC	=	diethyl pyrocarbonate
DNA	=	deoxyribonucleic acid
dNTPs	=	deoxyribonucleotide triphosphate
DTT	=	Dithiothreitol
EDTA	=	ethylenediamine tetraacetic acid
FReD	=	fibrinogen-related domain
FReP	=	fibrinogen-related protein
kDa	=	Kilodalton
LB	=	Luria Bertani
LCRD	=	luminal carbohydrate recognition domain
M	=	Molar
MRH	=	mannose 6-phosphate receptor homology
MASPs	=	mannose binding protein-associated serine proteases
MBP หรือ MBL	=	mannose binding protein
mM	=	Millimolar
mRNA	=	messenger ribonucleic acid
NAcGal	=	N-acetyl galactosamine
NAcGlc	=	N-acetyl-D-glucosamine
NAcMan	=	N-acetyl mannosamine
NAcNeu	=	N-acetyl neuraminic acid
O.D.	=	optical density
ORF	=	open reading frame
PAMPs	=	pathogen-associated molecular pattern
pH	=	-log hydrogen ion concentration

**สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ (ต่อ)**

pI	=	isoelectric pH
ppt	=	Prophenoloxidase
proPO	=	Prophenoloxidase
PRPs	=	pattern recognition proteins
RACE	=	rapid amplification of cDNA end
RT-PCR	=	reverse transcription-polymerase chain reaction
Tris	=	tris (hydroxymethyl) aminomethane
U	=	Unit
WSSV	=	white spot syndrome virus
x g	=	gravitation acceleration
X-Gal	=	5-bromo-4-choro-3-indolyl-beta-D-galactopyraniside
$\mu$ l	=	microliter
$\beta$	=	Beta
%	=	Percent

## บทที่ 1

### บทนำ

#### บทนำต้นเรื่อง

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำสามารถทำรายได้ให้แก่ประเทศไทยเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล และเป็นสินค้าอาหารทะเลที่ตลาดโลกมีความต้องการบริโภคเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง แต่อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำก็ประสบปัญหาภัยธรรมชาติและโรคระบาดทำให้ราคากุ้งเพิ่มขึ้น แม้ว่าประเทศไทยจะมีปริมาณการส่งออกสินค้าอาหารทะเลลดลงในปี 2554 แต่มูลค่าการส่งออกกุ้งและผลิตภัณฑ์กลับสูงถึงกว่า 100,000 ล้านบาท ซึ่งมูลค่าเพิ่มเกือบทั้งหมดมาจากทรัพยากรภายในประเทศ (local content) จากนั้นในปี 2555-2556 อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งไทยไม่สดใสมากนัก เนื่องจากเกิดปัญหาวิกฤติราคากุ้งตกต่ำอย่างหนัก สาเหตุมาจากความต้องการในตลาดหลักลดลงจากการประสบวิกฤติเศรษฐกิจ แม้ไทยจะอยู่ในฐานะผู้ผลิตที่มีศักยภาพ และเป็นผู้ส่งออกอันดับ 1 ของโลก แต่กลับต้องเผชิญกับปัญหาและอุปสรรคจากภายในและภายนอกประเทศ ที่มีแนวโน้มส่งผลกระทบต่อเนื่องกับอุตสาหกรรมกุ้งไทยในระยะต่อไปหากไม่ได้วางแผนเตรียมการหาแนวทางแก้ไขให้ทันการ ปัจจุบันคาดว่าอุตสาหกรรมกุ้งไทยมีแนวโน้มการผลิตที่ลดลง จากปัญหาสภาพอากาศแปรปรวน และโรคระบาด (ถนอมจิตร สิริภคพร, 2556) นอกจากนี้พบว่ามีประเทศผู้ผลิตกุ้งเข้ามาแข่งขันในตลาดโลกเพิ่มมากขึ้น ได้แก่ เอกวาดอร์ อินเดีย และอินโดนีเซีย ประกอบกับตลาดหลักส่งออกกุ้งของไทยทั้งสหรัฐอเมริกา สหภาพยุโรป และญี่ปุ่น (สมาคมอาหารแช่เยือกแข็งไทย, 2552) ยังประสบปัญหาเศรษฐกิจภายในประเทศโดยเฉพาะปัญหาหนี้สินในสหภาพยุโรปที่ยังคงยืดเยื้อ ทำให้ทุกภาคส่วนที่เกี่ยวข้องในอุตสาหกรรมกุ้งไทยต้องร่วมมือกันและเร่งปรับตัว โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลซึ่งจัดเป็นอาชีพทางการเกษตรที่มีบทบาทสำคัญในการพัฒนาประเทศอย่างยิ่ง เนื่องจากกุ้งทะเลเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีมูลค่าสูง เมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์น้ำชนิดอื่น ๆ ประเทศไทยจึงได้มีการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงกุ้งจนสามารถเลี้ยงในระบบหนาแน่นได้ เนื่องจากมีปัจจัยที่เอื้ออำนวย เช่น สภาพดินฟ้าอากาศที่เหมาะสม มีพ่อแม่พันธุ์กุ้งที่ดี จึงทำให้มีผลผลิตเพิ่มมากขึ้นซึ่งกุ้งที่เกษตรกรไทยนิยมเลี้ยงกันมากคือ กุ้งกุลาดำ (black tiger shrimp, *Penaeus monodon*) สามารถเพาะเลี้ยงในระบบหนาแน่น และทำรายได้ อย่างไรก็ตาม การเลี้ยงกุ้งกุลาดำได้ประสบปัญหา เนื่องจากมีสายพันธุ์ไม่เพียงพอสำหรับความต้องการ ขาดการพัฒนาสายพันธุ์ ทำให้กุ้งกุลาดำที่ได้ มีขนาดเล็ก โตช้า และต้นทุนการเลี้ยงสูงในขณะที่ราคากุ้งกลับถูกลง ส่งผลกระทบต่อการผลิตกุ้งเป็นอย่างมาก และประกอบกับเกิดโรคระบาดของเชื้อ

ไวรัส (virus) อย่างรุนแรงโดยเฉพาะโรคตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus, WSSV) และโรคหัวเหลือง (yellow head virus, YHV) จึงเป็นสาเหตุให้เกษตรกรหันมาเลี้ยงกุ้งแชบ๊วย (banana shrimp, *Fenneropenaeus merguensis*) เนื่องจากมีข้อได้เปรียบเรื่องต้นทุนต่ำกว่าการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ โรคที่เกิดกับกุ้งกุลาดำจะไม่นับเป็นรุนแรงในกุ้งแชบ๊วย และการเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยสลับกับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ จะช่วยลดวงจรการระบาดของโรคในบ่อเลี้ยงกุ้งได้ อย่างไรก็ตามการเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยก็ประสบปัญหาเช่นกัน เนื่องจากลูกกุ้งแชบ๊วยที่เลี้ยงนานกว่า 2 เดือน จะมีอัตราการเจริญเติบโตช้า เนื่องจากมีนิสัยที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงเมื่อสภาวะของน้ำเปลี่ยน ตื่นตกใจง่าย และมีอัตราการรอดตายต่ำกว่ากุ้งกุลาดำและกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) จึงเป็นจุดอ่อนของกุ้งแชบ๊วยทำให้พัฒนาได้ช้ากว่ากุ้งกุลาดำและกุ้งขาว (ธวัช ศรีวีระชัย และฐานันดร ทัดตานนท์, 2538) ประเทศไทยจึงมีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลโดยอาศัยพ่อแม่พันธุ์จากทะเล แต่ยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เพราะแนวโน้มการขาดแคลนพ่อแม่พันธุ์กุ้งทะเลจากแหล่งธรรมชาติเพื่อใช้ในการเพาะฟักลูกกุ้งมีความรุนแรงเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากสภาพแวดล้อมทางทะเลเปลี่ยนไปเป็นปัจจัยทำให้การเกิดโรคต่าง ๆ ในสัตว์น้ำมากขึ้น (Wootton *et al.*, 2003) และการเลี้ยงลูกกุ้งในบ่อเพื่อให้เป็นพ่อแม่พันธุ์ทดแทนจากการจับจากแหล่งธรรมชาติยังไม่ประสบผลสำเร็จ จากปัญหากุ้งแชบ๊วยมีพฤติกรรมที่เลี้ยงยากและอ่อนแอต่อโรค (ธนิษฐ ศรีทองสุข, 2531) ทำให้เกษตรกรหันมาเลี้ยงกุ้งขาวมากกว่ากุ้งแชบ๊วย ในปี พ.ศ. 2545 กรมประมงได้อนุญาตให้มีการนำพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวที่ปลอดเชื้อ เข้ามาเลี้ยงในประเทศไทย ซึ่งในช่วงนั้นเป็นช่วงเวลาเดียวกันที่การเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยกำลังประสบปัญหากุ้งโตช้า และเกิดโรคระบาดในกุ้งเพาะเลี้ยง ทำให้เกษตรกรส่วนใหญ่ประสบปัญหาการขาดทุน เกษตรกรบางส่วนได้ทดลองเลี้ยงกุ้งขาว ซึ่งส่วนใหญ่ให้ผลค่อนข้างดี จากกระแสการเลี้ยงกุ้งขาวที่ได้ผลดีกว่ากุ้งกุลาดำ ทำให้เกษตรกรจำนวนมากหันมาเลี้ยงกุ้งขาว และมีการขยายตัวด้านการเลี้ยงอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งปัจจุบันเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งส่วนใหญ่เปลี่ยนจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ มาเลี้ยงกุ้งขาวกันมากขึ้น เนื่องจากกุ้งขาวเป็นกุ้งที่ได้รับการพัฒนาสายพันธุ์มาอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน ทำให้เลี้ยงง่าย เจริญเติบโตเร็ว มีขนาดสม่ำเสมอ และสามารถเลี้ยงในอัตราความหนาแน่นสูงได้

กุ้งขาว เป็นกุ้งทะเลสายพันธุ์แปซิฟิก มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Litopenaeus vannamei* หรือ *Penaeus vannamei* มีขนาดใหญ่สุดยาวประมาณ 23 เซนติเมตร และมีแหล่งที่อยู่อาศัยตามชายฝั่งทะเลอันมหาสมุทรแปซิฟิก แลบประเทศเม็กซิโก ปานามา และเปรู กุ้งขาวเป็นกุ้งที่เคลื่อนไหวรวดเร็ว สามารถปรับตัวได้ดี กินอาหารได้หลายประเภท จึงเจริญเติบโตและปรับตัวให้เข้ากับการเลี้ยงแบบอัตราความหนาแน่นสูงในสภาพของบ่อที่เสื่อมโทรมได้ดีกว่ากุ้งกุลาดำ เนื่องจากกุ้งขาวมีความสามารถในการเคลื่อนที่ได้เร็วและว่ายน้ำอยู่ตลอดเวลาจึงต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิตสูงกว่ากุ้งกุลาดำ ระบบการให้อากาศในการเลี้ยงกุ้งขาวจึงต้องเพียงพอ กุ้งขาวปรับตัวเข้ากับการเลี้ยงแบบพัฒนาที่ปล่อยกุ้งหนาแน่นสูงได้ดีกว่ากุ้งกุลาดำ อย่างไรก็ตามการเลี้ยงกุ้งขาวยังต้องการหลักวิชาที่แตกต่างจากกุ้งกุลาดำ ปัจจุบันนักวิชาการและนักวิจัยจึงให้



ความสนใจศึกษาและหาแนวทางเพาะฟักและเลี้ยงกุ้งขาวให้ดียิ่งขึ้น แต่ก็มีปัญหาที่หลีกเลี่ยงได้ยากคือ โรคติดเชื้อในกุ้งซึ่งมีสาเหตุหลักมาจากเชื้อ WSSV เมื่อกุ้งได้รับเชื้อนี้จะเกิดเป็นโรคตัวแดงดวงขาวทำให้กุ้งตาย ก่อให้เกิดปัญหาในการเพาะเลี้ยง ทำให้ผู้เพาะเลี้ยงขาดทุนและการส่งออกกุ้งทะเลลดน้อยลง (Söderhäll and Cerenius, 1998)

จากเหตุผลดังกล่าวทำให้มีการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันโรค (immune system) ในกุ้งมากขึ้น ซึ่งเป็นพื้นฐานในการควบคุมและแก้ไขปัญหาโรคติดเชื้อในกุ้ง (Bulgakov *et al.*, 2004) กุ้งเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่มครัสเตเชียน (crustacean) มีกลไกการป้องกันตนเองโดยอาศัยระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะซึ่งพบทั้งในสัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลังเป็นส่วนใหญ่ ทั้งนี้เพราะในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังไม่มีระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ดังนั้นการป้องกันตนเองจากเชื้อโรคจะมาจากระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (Loker *et al.*, 2004) เพียงอย่างเดียว สัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน รวมทั้งกุ้งแชบ๊วย กุ้งกุลาดำ กุ้งขาวและกุ้งอื่น ๆ มีภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ (Yu *et al.*, 2002) คือ ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (cellular immunity) มักใช้เซลล์เม็ดเลือดฮีโมไซท์ (hemocyte) เป็นหลักในการต่อสู้และกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยอาศัยการกลืนกินเซลล์โดยวิธีฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) การสร้างโนดูล (nodule formation) และการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม (encapsulation) ภูมิคุ้มกันในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนอีกระบบ คือ ระบบภูมิคุ้มกันโดยอาศัยสารน้ำ (humoral immunity) ที่ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด (Söderhäll and Cerenius, 1998) โปรตีนเหล่านี้มีปริมาณเพิ่มขึ้นในฮีโมลิมฟ์ (hemolymph) เมื่อสัตว์มีการติดเชื้อหรือถูกกระตุ้น สัตว์น้ำในกลุ่มอาร์โทรพอด (arthropod) เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่ไม่มีระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะซึ่งทำงานโดยแอนติบอดี (antibody) แต่มีกลไกการป้องกันตนเองจากเชื้อโรคต่าง ๆ ผ่านโปรตีนในพลาสมา (plasma protein) สัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนมีโปรตีนที่สำคัญ 2 กลุ่มที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเอง กลุ่มแรก ได้แก่ระบบโปรเฟโนออกซิเดส (prophenoloxidase (proPO) system) หรือระบบ proPO ซึ่งเป็นกลไกการป้องกันตนเองที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase) นำไปสู่การสังเคราะห์เมลานิน (melanin) เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคผ่านวิธีฟาโกไซโทซิสได้ โปรตีนอีกกลุ่มคือ แอ็กกลูตินิน (agglutinin) หรือเลคติน (lectin) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) บนผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ทำให้เซลล์เกาะกลุ่ม (agglutinate) เพื่อกำจัดการบุกรุกของจุลินทรีย์ได้ (Banerjee *et al.*, 2004)

เลคติน เป็นองค์ประกอบสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันแบบที่มีมาตั้งแต่กำเนิด (innate immunity) มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองของสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังและพืช ในครัสเตเชียนมีเลคตินซึ่งเป็นโปรตีนในฮีโมลิมฟ์ ที่ทำหน้าที่เป็น pattern recognition proteins (PRPs) (Medzhitov and Janeway, 1997) ซึ่งจัดจำองค์ประกอบที่เป็นคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์ของผู้บุกรุก ส่งผลให้เกิดกระบวนการยับยั้งหรือทำลายผู้บุกรุก

ต่อไป เลคตินเป็นโปรตีนหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ในกุ้งและสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนอื่น ๆ โดยทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเอง เช่น ทำให้เซลล์แบคทีเรียหรือเซลล์อื่น ๆ รวมถึงไวรัสบางชนิดเกิดการเกาะกลุ่ม กระตุ้นให้เกิดฟาโกไซโทซิสและการเกิดออปโซไนซ์ (opsonization) เลคตินในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังบางชนิดกระตุ้นให้เกิดกลไกการป้องกันตนเองแบบอื่น ๆ เช่น เลคตินจากหนอนใยยาสูบ (*Manduca sexta*) กระตุ้นให้ระบบโปรตีนออกซิเดสทำงาน เป็นต้น (Yu *et al.*, 2002)

เลคตินที่พบในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนมีโครงสร้างหลากหลาย โดยโครงสร้างของเลคตินแต่ละชนิดจะมีโดเมน (domain) ที่ใช้ในการจดจำโครงสร้างของคาร์โบไฮเดรตแตกต่างกันไป แต่โดเมนที่พบมากที่สุดในการโครงสร้างของเลคตินที่มีรายงานของสัตว์ในกลุ่มนี้ได้แก่ carbohydrate recognition domain (CRD) และ fibrinogen-related domain (FReD) เลคตินส่วนใหญ่ที่มีการศึกษาในกุ้งจะมีโครงสร้างที่ประกอบด้วย CRD หนึ่งหรือสองโดเมน และเลคตินที่พบส่วนใหญ่จัดเป็นแบบ C (C-type lectin) ซึ่งต้องการ  $Ca^{2+}$  ในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงหรือจุลินทรีย์ ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเอง ในกุ้งขาวมีรายงานการพบเลคตินแบบ C ที่มีความจำเพาะต่อกรดไซอะลิก (sialic acid) ในฮีโมลิมฟของกุ้งขาว ซึ่งสามารถทำให้แบคทีเรียก่อโรค *Vibrio anguillarum* เกิดการเกาะกลุ่ม (Sun *et al.*, 2007) บ่งชี้ว่าเลคตินมีบทบาทสำคัญในกลไกการตอบสนองต่อเชื้อก่อโรค และยังมีรายงานการพบยีนเลคตินแบบ C ของกุ้งขาว 7 ยีน ซึ่งประกอบด้วย CRD 1 หรือ 2 โดเมน (Ma *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009b; Zhao *et al.*, 2009; Junkunlo *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014) จากข้อมูลข้างต้นพบว่าเลคตินที่มีการศึกษาในกุ้งขาวทั้งหมดเป็นกลุ่มที่มีโครงสร้างประกอบด้วย CRD ในขณะที่เลคตินที่มี FReD เป็นองค์ประกอบยังมีการศึกษาน้อยมากในสิ่งมีชีวิตกลุ่มนี้และไม่พบรายงานในกุ้งขาว โปรตีนที่มี FReD อยู่ในโครงสร้างหรือที่เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจน (fibrinogen-related protein, FReP) เป็นโปรตีนที่มีการพบเมื่อไม่นานมานี้ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง แต่เมื่อรายงานการพบโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังมีจำนวนเพิ่มขึ้น ทำให้ทราบหน้าที่ของโปรตีนชนิดนี้ในการเป็น PRP ที่ใช้ในการจดจำโครงสร้างของจุลินทรีย์บุกรุก อย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนในครัสเตเชียนยังมีไม่มากนัก โดยมีรายงานในกุ้งกุลาดำ (Angthong *et al.*, 2010) และในกุ้งนาง (crayfish, *Pacifastacus leniusculus*) ซึ่งทำหน้าที่เป็นโปรตีนที่ยับยั้งกระบวนการสร้างเมลานิน (Söderhäll *et al.*, 2009) ต่อมาพบโปรตีนที่มีโครงสร้างเหมือน ficolin (ficolin-like protein) จากกุ้งนาง (Wu *et al.*, 2011) จากกุ้งก้ามกราม (giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*) (Zhang *et al.*, 2014) และมีการพบโปรตีนในกุ้งลายเสือ (kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*) อีก 2 ชนิดคือ MjFREP1 (Chai *et al.*, 2012) และ MjFREP2 (Sun *et al.*, 2014) นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบโปรตีนจากกุ้งแชบ๊วย คือ

FmFReP (ยังไม่เผยแพร่) จากรายงานของโปรตีนดังกล่าวในกุ่มเหล่านี้บ่งชี้ได้ว่าโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนมีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิตดังกล่าวทั้งสิ้น

เนื่องจากยังไม่พบรายงานของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนในกุ่มชาวดังนั้นงานวิทยานิพนธ์นี้จึงสนใจที่จะโคลนยีนและศึกษาสมบัติระดับโมเลกุลของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนจากกุ่มขาว (LvFReP) รวมถึงศึกษาการแสดงออกของยีนนี้ที่ตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อก่อโรคในกุ่มขาว ซึ่งงานวิทยานิพนธ์นี้จะทำให้ทราบข้อมูลพื้นฐานระดับโมเลกุลและเข้าใจบทบาทในการป้องกันตนเองของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนซึ่งเป็นเลคตินชนิดใหม่ของกุ่มขาว หลังจากถูกกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรคในกุ่มมากยิ่งขึ้น

## การตรวจเอกสาร

### 1. กุ้งขาว

กุ้งขาวมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Litopenaeus vannamei* หรือ *Penaeus vannamei* ค้นพบโดย Boone ในปี ค.ศ. 1931 มีชื่อสามัญว่า white shrimp หรือ whiteleg shrimp (รูปที่ 1) และมีชื่อภาษาไทยคือ กุ้งขาว กุ้งขาวแปซิฟิก โดยมีลำดับอนุกรมวิธานรายงานไว้ดังนี้ (Perez Farfante and Kensley, 1997)

Phylum Arthropoda

Subphylum Crustacea

Class Malacostraca

Order Decapoda

Family Penaeidae

Genus *Litopenaeus*

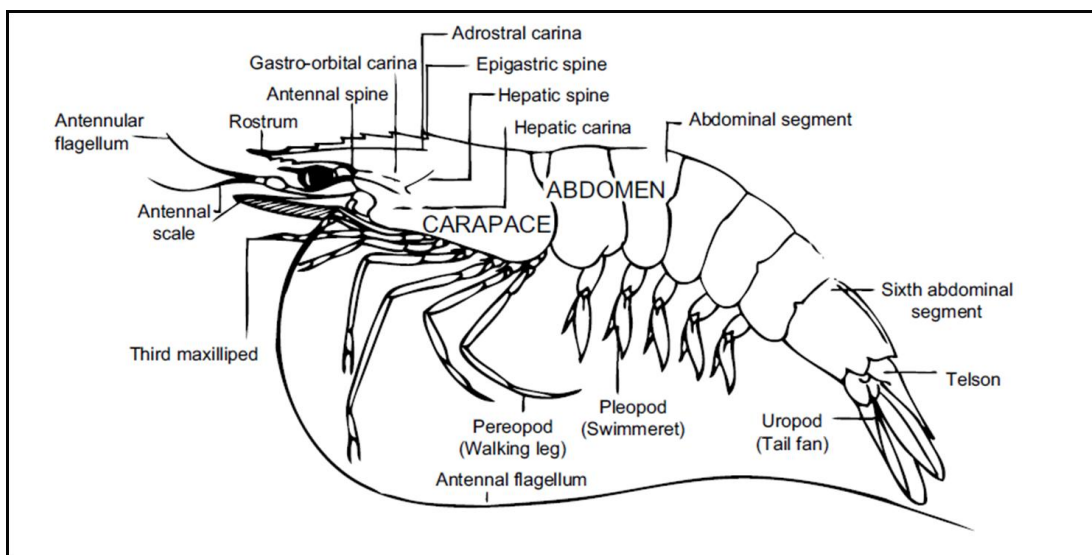
Species *vannamei*



รูปที่ 1 กุ้งขาว (white shrimp, *Litopenaeus vannamei*)

### 1.1 ชีวิตาและลักษณะทั่วไป

กุ้งขาว เป็นกุ้งที่มีการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลาย มีลำตัวค่อนข้างเรียวยาว หัวเล็ก ลักษณะที่สำคัญของสัตว์กลุ่มนี้คือ ลำตัวแบ่งเป็นข้อปล้องแบ่งได้ 3 ส่วน คือ ส่วนหัว (head) ส่วนอก (thorax) และส่วนลำตัว (abdomen) รูปที่ 2 พบว่าส่วนหัวและส่วนอกมีการรวมตัวเข้าด้วยกัน เรียกว่า cephalothorax และส่วนลำตัวมี 6 ปล้อง มีรยางค์ยื่นออกมาปล้องละ 1 คู่ ได้แก่ หนวด รยางค์ปาก ขาเดิน ขาวายน้ำ เป็นต้น กุ้งขาวมีเปลือกหุ้มลำตัวเป็นโครงสร้างภายนอก (enveloping exoskeleton) เปลือกประกอบด้วยไคติน (chitin) และโปรตีน ส่วนของเปลือกแต่ละข้อปล้องเชื่อมติดกันด้วยเนื้อเยื่อบาง ๆ (articular membrane) มีการลอกคราบเป็นระยะ ๆ เพื่อการเจริญเติบโต อวัยวะภายในของกุ้งขาว ได้แก่ กระเพาะอาหาร หัวใจ เหงือก อวัยวะเพศจะอยู่บริเวณส่วนหัวและอก กุ้งขาวมีขนาดเล็ก ตัวที่สมบูรณ์เต็มที่มีลำตัวยาว 5-10 เซนติเมตร กุ้งขาวมีลักษณะพิเศษ คือ ลำตัวสีขาว หน้าอกใหญ่ ผิวเรียบเกลี้ยงเป็นมัน มีลักษณะเปลือกบาง กริในระยะวัยอ่อนจะยาวกว่าก้านหนวด (antennular flagellum) เมื่อโตขึ้นกริจะมีขนาดสั้นลง ฟันกริด้านล่าง (ventral teeth) มี 2-4 อัน ฟันกริด้านล่างมี 2 กริ และฟันกริด้านบนมี 8 กริ ส่วนร่องบนกริมองเห็นได้ชัดเจน หนวดคู่ที่ 1 (antennules) ไม่มีหนามที่อยู่บริเวณปล้องแรกของหนวด แผ่นรยางค์ของ maxilla คู่ที่ 1 ยาว เป็น 3-4 ส่วนของหาง (telson) เรียบ (ภิญโญ เกียรติภิญโญ , 2545)



รูปที่ 2 สัณฐานวิทยาของกุ้ง (Motoh, 1985)

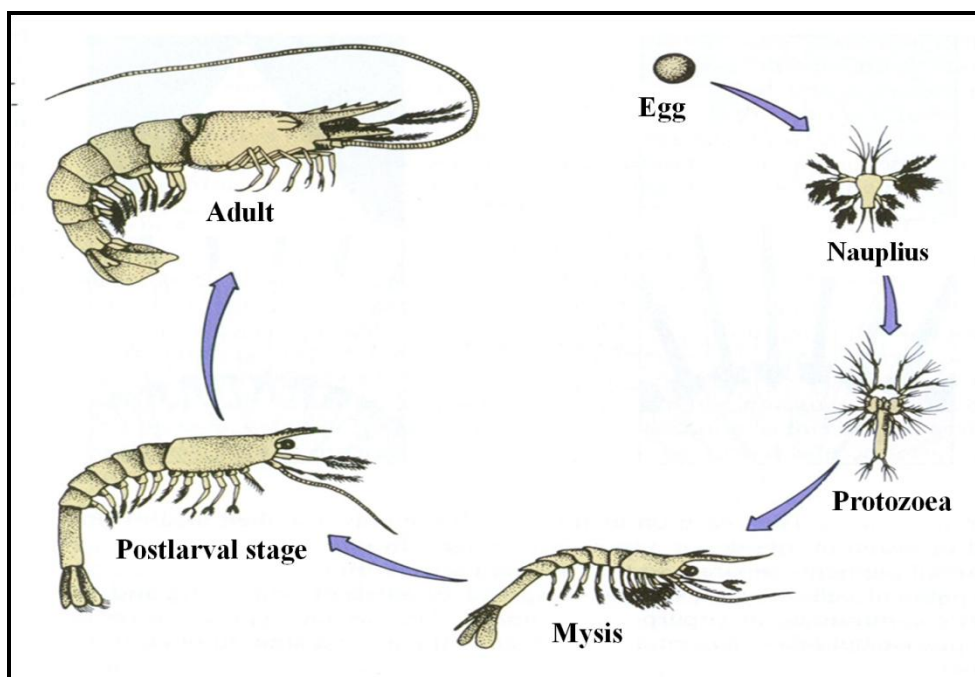
## 1.2 การแพร่กระจายและพฤติกรรมการกินอาหาร

กุ้งขาว มีแหล่งที่อยู่อาศัยตามชายฝั่งทะเลย่านมหาสมุทรแปซิฟิก แถบประเทศอเมริกา เม็กซิโก กัวเตมาลา นิคารากัว คอสตาริกา ปานามา โคลัมเบีย เอกวาดอร์ และเปรู กุ้งสายพันธุ์นี้เป็นสัตว์ที่มีความแข็งแรงและทนทานจึงมีการขยายพันธุ์ตามธรรมชาติได้กว้างไกล กุ้งเป็นสัตว์หน้าดิน ชอบอาศัยตามพื้นทะเล (สุรินทร์ มัจฉาชีพ, 2535) พบมากบริเวณน้ำตื้น ปากอ่าวหรือปากแม่น้ำที่น้ำค่อนข้างขุ่น บางครั้งจะพบอยู่รวมกันเป็นกลุ่มจำนวนมาก พบลูกกุ้งระยะหลังตัวอ่อน (postlarva) และวัยรุ่น (juvenile) ได้ทั่วไปตามชายฝั่งทะเลที่มีพื้นดินเลนและพื้นดินโคลนปนทราย ที่เหมาะแก่การเจริญเติบโตและเป็นแหล่งอาหารที่สมบูรณ์ โดยอาศัยอยู่ตั้งแต่ชายฝั่งจนถึงทะเลลึก พบทั้งในทะเลและเขตน้ำกร่อยที่มีความเค็มระหว่าง 10–30 ppt ส่วน pH ที่เหมาะสมประมาณ 7.0–8.5 อุณหภูมิ 28–30 °C พบอาศัยอยู่ตามแนวชายฝั่ง จนถึงบริเวณที่มีความลึก 72 เมตร (Dore and Frimodt, 1987)

กุ้งขาว มีลักษณะการกินอาหารแบบกัดแทะโดยจับชิ้นอาหารแล้วว่ายน้ำ กัดกินอาหารไปเรื่อย ๆ ซึ่งเป็นพฤติกรรมที่ต่างจากกุ้งกุลาดำที่มีนิสัยการกินอาหารแบบจับชิ้นอาหารแล้วหยุดกัดกินอาหารนิ่งอยู่กับที่ กุ้งขาวปราดเปรียว เคลื่อนไหวได้รวดเร็วและว่ายน้ำอยู่ตลอดเวลา อาหารตามธรรมชาติของกุ้งขาว ได้แก่ สาหร่ายชนิดต่าง ๆ แพลงก์ตอน ซากพืช ซากสัตว์ สัตว์หน้าดิน เช่น หอย ปลา ลูกกุ้ง

## 1.3 วงจรชีวิตและการสืบพันธุ์ของกุ้งขาว

กุ้งขาว มีอวัยวะเพศภายนอกมองเห็นได้ชัดเจน โดยอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้เรียกว่า petasma มีลักษณะกึ่งเปิดคล้ายรูปตะขอยู่ในส่วนของ endopod ของขาว่ายน้ำ (pleopod) คู่ที่ 1 อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย เรียกว่า thelycum เป็นแบบเปิด (opened thelycum) ตั้งอยู่บริเวณฐานของขาเดินคู่ที่ 4 และ 5 พัฒนาเป็นถุงสำหรับรับน้ำเชื้อเพศผู้ โดยเพศผู้จะใช้ขาเดินคู่ที่ 5 เชี่ยวอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ ซึ่งอยู่ที่ขาว่ายน้ำคู่ที่ 1 ซึ่งเป็นอวัยวะที่ช่วยในการปล่อยน้ำเชื้อแล้วจับ petasma สอดเข้าไปที่ thelycum ของตัวเมีย ซึ่งในกุ้งชนิดนี้ไข่ของตัวเมียจะอยู่ข้างใน ส่วนของน้ำเชื้อที่เข้าไปจะอยู่ด้านนอก ปากรูของ thelycum ต้องเปิดก่อนถึงจะเก็บน้ำเชื้อที่ได้รับมา ทำให้ปริมาณของเชื้อตัวผู้ที่เข้าปฏิสนธิกับไข่เป็นไปได้ไม่สมบูรณ์ ทำให้โอกาสในการเจริญเติบโตของตัวอ่อนน้อยกว่ากรณีของกุ้งกุลาดำและกุ้งแชบ๊วย การเจริญพัฒนาของกุ้งขาวตั้งแต่แม่กุ้งวางไข่จนถึงระยะ postlarva จะใช้เวลาประมาณ 10 วัน ประกอบด้วย 4 ระยะ (ประจวบ หล้าอุบล, 2530) คือ nauplius, protozoa, mysis, postlarva (รูปที่ 3) กุ้งขาวตัวเต็มวัยจะวางไข่ในทะเล จากนั้นตัวอ่อนจะเคลื่อนที่ไปอาศัยบริเวณชายฝั่งหรือป่าชายเลน ซึ่งเป็นบริเวณที่มีอาหารธรรมชาติสมบูรณ์ กุ้งระยะนี้จะเลี้ยงตัวเองจนโตใช้เวลาประมาณ 1–2 เดือน ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมของพื้นที่ จนกระทั่งเมื่อโตเป็นตัวเต็มวัย อายุประมาณ 2–3 เดือน จะย้ายสู่บริเวณชายฝั่งน้ำตื้นจนเจริญเข้าสู่ระยะก่อนวัยเจริญพันธุ์ (subadult) ซึ่งมีอายุประมาณ 3–4 เดือน จึงจะกลับลงสู่ทะเลเปิดเพื่อแพร่ขยายพันธุ์ต่อไป



รูปที่ 3 วงจรชีวิตของกุ้งในกลุ่มพีเนียด

(<http://upic.me/show/4296879> วันที่สืบค้น 19 มีนาคม 2557)

## 2. ระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิตกลุ่มครัสเตเชียน

สิ่งมีชีวิตกลุ่มครัสเตเชียน เช่น กุ้ง กั้ง และปู เป็นสัตว์ที่มีเปลือกแข็งภายนอกไม่มีกระดูกสันหลัง ดังนั้นสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนจึงจำเป็นต้องมีกลไกการป้องกันตนเอง (defense mechanism) ที่มีประสิทธิภาพ เพื่อให้อยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา กลไกการป้องกันตนเองของสัตว์โดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 2 ระบบ คือระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะที่อาศัยแอนติบอดี พบในสัตว์มีกระดูกสันหลัง และระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non specific immune response) พบทั้งในสัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลังเป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังไม่มีระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ดังนั้นกลไกการป้องกันตนเองจากเชื้อก่อโรคของสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนซึ่งรวมทั้ง กุ้งแชบ๊วย กุ้งกุลาดำ กุ้งขาวและกุ้งชนิดอื่น ๆ มาจากระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (Loker *et al.*, 2004) โดยแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ ระบบภูมิคุ้มกันแบบอาศัยเซลล์ และระบบภูมิคุ้มกันโดยอาศัยสารน้ำ (Yu *et al.*, 2002)

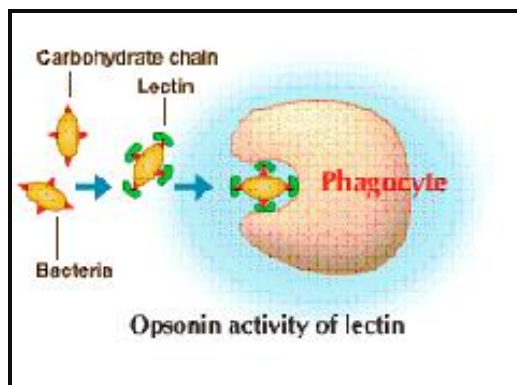
## 2.1 ระบบภูมิคุ้มกันแบบอาศัยเซลล์ (Cellular immunity system)

กลไกการป้องกันตนเองโดยใช้เซลล์ในการกำจัดเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมพบในสิ่งมีชีวิตเกือบทุกชนิด แต่มีข้อแตกต่างตามวิวัฒนาการ สัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนมักใช้เซลล์ฮีโมไซท์เป็นหลักในการต่อสู้และกำจัดสิ่งแปลกปลอม (Bauchau, 1981) โดยทำปฏิกริยาร่วมกันระหว่างตัวรับ (receptor) บนผิวเซลล์เม็ดเลือดและโมเลกุลของสิ่งมีชีวิตที่บุกรุก เช่น แบคทีเรีย พาราไซต์ (parasite) และไวรัส ซึ่งสามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยวิธีต่าง ๆ ได้แก่ การกลืนกิน เซลล์ด้วยวิธีฟาโกไซโทซิส การเกิดโนดูล และการกักล้อมสิ่งแปลกปลอม (Söderhäll and Cerenius, 1992)

### 2.1.1 การเกิดฟาโกไซโทซิส (Phagocytosis)

การเกิดฟาโกไซโทซิสเป็นกระบวนการที่สำคัญอย่างหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกัน เป็นกลไกที่เซลล์ใช้เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุกเข้ามาในร่างกาย ซึ่งเป็นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ พบในสิ่งมีชีวิตเกือบทุกชนิดแต่แตกต่างกันออกไปตามวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต กระบวนการฟาโกไซโทซิสในครัสเตเชียนเกิดจากการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดและโปรตีนเปอร์ออกซิเนคติน (peroxinectin) ในน้ำเลือดทำให้เกิดการเกาะติดระหว่างเซลล์เม็ดเลือดและสิ่งแปลกปลอม และเมื่อเลคตินจับกับสิ่งแปลกปลอมจะกระตุ้นให้มีการจับของเซลล์ฟาโกไซท์ในการเกิดการออปไซโนซิส (รูปที่ 4) (Söderhäll and Cerenius, 1992) โดยจะเกิดกับสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดเล็ก และจำนวนน้อย เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมผ่านชั้นผิวปกคลุมเข้าสู่ร่างกายจะมีการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมโดยยื่นไซโทพลาซึม (cytoplasm) ไปล้อมรอบสิ่งแปลกปลอม เซลล์ฮีโมไซท์จะหลั่งสารช่วยย่อยจากไลโซโซม (lysosome) ซึ่งมีสารต้านแบคทีเรีย hydrolytic enzyme รวมทั้ง cytotoxic radical เพื่อใช้ในการฆ่าและย่อยสลายเชื้อโรค (Song and Hsieh, 1994; Munoz *et al.*, 2000) หลังจากการทำลายและย่อยสลายสิ่งแปลกปลอมแล้ว จะปล่อยส่วนที่ย่อยสลายออกนอกเซลล์ต่อไป





รูปที่ 4 การจับของเลคตินกับเซลล์แปลกปลอมกระตุ้นการเกิด opsonization และ phagocytosis (Hatakeyama *et al.*, 1995)

### 2.1.2 การเกิดโนดูล (Nodule formation)

การเกิดโนดูลจะเกิดเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมจำนวนมากทำให้กระบวนการฟาโกไซโทซิสไม่สามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกได้หมด จึงต้องการกระบวนการสร้างโนดูล โดยเกิดการรวมตัวของเซลล์เม็ดเลือดในระบบไหลเวียนเลือด เพื่อโอบล้อมสิ่งแปลกปลอมไม่ให้กระจายหรือเคลื่อนที่ไปในร่างกาย และมักพบการเกิดกระบวนการสร้างเมลานิน โดยการทำงานของเอนไซม์ฟีโนลออกซิเดส (Söderhäll and Cerenius, 1992)

### 2.1.3 การกักล้อมสิ่งแปลกปลอม (Encapsulation)

การกักล้อมสิ่งแปลกปลอมเป็นกระบวนการที่คล้ายกับกระบวนการสร้างโนดูล แต่กระบวนการนี้เกิดขึ้นเมื่อสิ่งแปลกปลอมมีขนาดใหญ่มากกว่า 10 ไมโครเมตร เช่น พาราไอท์ต่าง ๆ บุกรุกเข้ามาในร่างกาย ซึ่งเกินความสามารถที่กระบวนการฟาโกไซโทซิสจะกำจัดได้ กระบวนการนี้เกิดจากเซลล์ฮีโมไซท์ชนิดเซมิกรานูลาร์ (semi-granular hemocyte) กักล้อมสิ่งแปลกปลอมและหลั่งสารบางชนิดมาหุ้มสิ่งแปลกปลอมไว้เป็นก้อนเล็ก ๆ พร้อมกับสังเคราะห์เมลานินเพื่อทำลายสิ่งบุกรุกนั้น (กิจการ ศุภมาตย์ และคณะ, 2543)

## 2.2 ระบบภูมิคุ้มกันโดยอาศัยสารน้ำ (Humoral immunity)

ระบบภูมิคุ้มกันโดยอาศัยสารน้ำ เช่น เอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สลายผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive) ด้วยวิธีการทำให้เซลล์แตก (hydrolysis) (Söderhäll and Cerenius, 1992) สำหรับแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative) ไลโซไซม์มีฤทธิ์เล็กน้อยไม่สามารถทำให้เกิดการสลายของผนังเซลล์ และยังช่วยทำให้แบคทีเรียมีความไวมากขึ้นต่อสารต้านเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ และเนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะถูกออกแบบเพื่อจดจำรายละเอียดเล็ก ๆ น้อย ๆ ที่บอกถึงความแตกต่างของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด โดยที่โครงสร้างของเชื้อต่าง ๆ มีรูปแบบที่เฉพาะตัวเรียกว่า pathogen-associated

molecular patterns (PAMPs) (Wang *et al.*, 2007; Janeway and Medzhitov, 2002) โปรตีนที่สามารถจดจำโมเลกุลเหล่านี้เรียกว่า PRPs โดยจดจำและจับกับโมเลกุล PAMPs (Christophides *et al.*, 2002) เลคตินจัดเป็น PRP ชนิดหนึ่งที่มีการศึกษากันมากในสัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลังและพบว่าทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเอง

### 3. เลคติน (Lectin)

เลคตินเป็นโปรตีนหรือไกลโคโปรตีน (glycoprotein) มีคุณสมบัติในการจับคาร์โบไฮเดรตหรือน้ำตาลได้อย่างจำเพาะเจาะจง บริเวณผิวเซลล์ (cell surface) มีโครงสร้างที่ประกอบด้วยไกลโคโปรตีนและไกลโคลิพิด (glycolipid) หลายชนิด น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของโครงสร้างผิวเซลล์จะเป็นตำแหน่งที่เลคตินสามารถเข้าจับกับเซลล์หรือสิ่งแปลกปลอมได้ (Bies *et al.*, 2004) เลคตินมีแหล่งจับจำเพาะที่จับกับน้ำตาลอย่างน้อย 2 ตำแหน่ง (Kocurek and Horejsi, 1981) ความจำเพาะในการจับน้ำตาลขึ้นอยู่กับชนิดของเลคติน (Sharon, 1977) โดยเลคตินจะจับกับน้ำตาลอย่างหลวม ๆ ด้วยพันธะที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ (non-covalent bond) และสามารถผันกลับได้ เช่นเดียวกับการจับระหว่างเอนไซม์ (enzyme) กับสับสเตรท (substrate) และการจับของแอนติเจน (antigen) กับแอนติบอดี (Sharon, 1977) เลคตินไม่ได้มีโครงสร้างเป็นอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) เนื่องจากเลคตินเกิดเองตามธรรมชาติในสิ่งมีชีวิต ไม่ได้สร้างขึ้นจากการกระตุ้นจากสิ่งเร้าหรือสิ่งแปลกปลอมภายนอกร่างกายเหมือนแอนติบอดี เลคตินยังมีโครงสร้างต่างกันในเรื่องมีชีวิตชนิดเดียวกันและต่างชนิดกัน เลคตินพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ทั้งใน พืช สัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง ในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ เช่น รา (fungi) สาหร่าย (algae) ยีสต์ (yeast) แบคทีเรียหรือไวรัส เลคตินอาจอยู่ในรูปสารละลายหรือเป็นส่วนประกอบของเมมเบรน (membrane) (Barondes, 1986) ซึ่งเลคตินจากแหล่งต่างกันจะมีน้ำหนักโมเลกุลและสมบัติแตกต่างกันไป เนื่องจากงานวิทยานิพนธ์นี้ศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนจากกุ้งขาว จึงขอกล่าวเฉพาะเลคตินที่พบในสัตว์

ก่อนหน้านี้เลคตินที่พบในสัตว์ส่วนใหญ่ถูกจำแนกออกเป็น 2 กลุ่ม (Drickamer, 1988) คือ เลคตินชนิด C และ เลคตินชนิด S (S-type lectin) แต่แท้จริงแล้ว พบว่าแอกทิวิตี (activity) และหน้าที่ของเลคตินแตกต่างกัน เป็นเพราะมีโครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) ที่ต่างกัน จากรายงานพบว่า เลคตินมี 12 โครงสร้าง (Kilpatrick, 2002) โดยเรียกชื่อต่าง ๆ กัน เช่น เลคตินชนิด C ต้องการแคลเซียมไอออน ( $Ca^{2+}$ ) ในการเกิดปฏิกิริยา ส่วนเลคตินชนิด S ต้องการหมู่ไธออล (thiol group) เป็นองค์ประกอบในการทำปฏิกิริยาในบริเวณที่สามารถจับกับน้ำตาลได้ ซึ่งจะกล่าวรายละเอียดในลำดับต่อไป นอกจากนี้ยังมีเลคตินอื่น ๆ เช่น pentraxin อาจรวมอยู่ในเลคตินชนิด C เนื่องจากเป็นเลคตินที่ต้องการแคลเซียมไอออนเป็นองค์ประกอบแต่เกิดจากหน่วยย่อยของสายโพลีเปปไทด์ (polypeptide) 5 หน่วยมาเชื่อมต่อกันเป็นวงแหวน โดยแต่ละหน่วยขดเป็นก้อนกลม ๆ เท่า ๆ กัน เลคตินชนิดนี้มีหน้าที่กระตุ้นให้ระบบต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง

ทำงานได้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น (Kilpatrick, 2002) เลคตินชนิด P (P-type, phosphomannosyl receptor) เป็นเลคตินที่เป็นโปรตีนในเมมเบรน (transmembrane protein) พบในสัตว์มีกระดูกสันหลัง โดยจับจำเพาะกับตัวรับ 5 แมนโนส-6-ฟอสเฟต (mannose-6-phosphate receptor) เลคตินบางชนิดนอกจากมีตำแหน่งที่จับกับน้ำตาลแล้วยังมีตำแหน่งพิเศษอื่น ๆ อีก เช่น เลคตินชนิด I-type หรือ immunoglobulin (Ig)-type เป็นเลคตินที่พบในสัตว์มีกระดูกสันหลัง ซึ่งนอกจากมีตำแหน่งจับกับน้ำตาลแล้วยังมีโดเมนที่คล้ายกับอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin-like domain) โดยพบว่าเลคตินชนิดนี้มีส่วนในการกระตุ้นสารอื่น ๆ ในระบบภูมิคุ้มกันเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย (Kilpatrick, 2002) เลคตินชนิดฟิโคลิน (ficolin), tachylectin 5A, 5B และ *Limax flavus* agglutinin มีบริเวณพิเศษที่คล้ายกันคือมีโดเมนที่คล้ายไฟบริโนเจน (FRcD) ส่วนเลคตินชนิดอื่น ๆ มีสมบัติต่าง ๆ กัน ซึ่งมีหลายโครงสร้างที่สามารถจับจำเพาะกับน้ำตาลได้ และบางชนิดสามารถจดจำสารชีวเคมีอื่น ๆ นอกเหนือจากคาร์โบไฮเดรต ในจำนวนเลคตินเหล่านี้มีหลายชนิดที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ โดยสามารถจดจำเชื้อโรคต่าง ๆ ที่บุกรุกได้ (Kilpatrick, 2002) ซึ่งเลคตินเหล่านี้มักประกอบด้วยหน่วยย่อย (subunit) หลายหน่วย แต่ละหน่วยย่อยมีตำแหน่งจับกับคาร์โบไฮเดรต โดยงานวิทยานิพนธ์นี้จะขอกกล่าวถึงเลคติน 2 กลุ่มใหญ่ คือ เลคตินชนิด C และ เลคตินชนิด S

### 3.1 เลคตินชนิด C

เลคตินชนิด C เป็นเลคตินที่มีจำนวนกรดอะมิโนประมาณ 130 หน่วยในบริเวณที่เป็น CRD (Wang *et al.*, 2007) และเป็นบริเวณที่ต้องการแคลเซียมไอออน ในการเกิดปฏิกิริยา (Sharon and Lis, 1995) และพบว่าต้องการตัวรับจำเพาะ (specific receptor) และสามารถจดจำโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) โปรตีนในซีรัม (serum protein) สารชีวโมเลกุลอื่น ๆ ที่อยู่นอกเซลล์ (extracellular matrix) และโปรตีนหรือลิพิด (lipid) บริเวณผิวเซลล์ได้ด้วยกระบวนการต่าง ๆ โดยเป็นตัวกลางในกระบวนการทางชีวภาพ เช่น การเกาะกลุ่มของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงของสารไกลโคโปรตีนในซีรัม และการตอบสนองต่อเชื้อก่อโรคโดยกระตุ้นให้เกิดกระบวนการป้องกันตนเองในระบบภูมิคุ้มกัน (Drickamer, 1988) เลคตินชนิด C เช่น คอลเลคติน (collectin) และฟิโคลิน มักพบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เลคตินชนิดนี้จะเกิดแอกทิวที่ได้ดีที่ pH สูงหรือภาวะที่เป็นเบส (base) มีพันธะไดซัลไฟด์ (disulphide bond) ในโครงสร้างโมเลกุล มีความจำเพาะกับน้ำตาลได้หลายชนิด และพบในส่วนของของเหลวภายนอกเซลล์ (extracellular fluid) เลคตินในสัตว์กลุ่มครึ่งเตี๋ยนส่วนใหญ่พบว่า เป็นเลคตินชนิด C เช่น เลคตินจากกิ้งกูดดำ กุ้งแชบ๊วย กุ้ง *Penaeus stylirostris*, *Penaeus californiensis*, *Parapenaeus longirostris* เป็นต้น (Rittidach *et al.*, 2007) ส่วนเลคตินจากกุ้ง *Jasus verreauxi* กุ้งลายเสือ หรือกุ้ง *Penaeus paulensis* เป็นชนิดที่ไม่ต้องการแคลเซียมในการทำงาน (Cominetti *et al.*, 2002)

### 3.2 เลคตินชนิด S

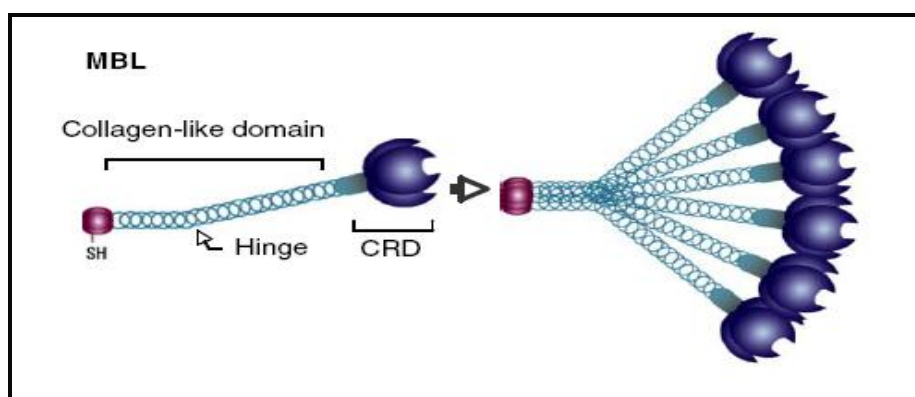
เลคตินชนิด S เป็นเลคตินที่มีจำนวนกรดอะมิโนบริเวณ CRD ประมาณ 130 หน่วย คล้ายกับเลคตินชนิด C เลคตินชนิด S เป็นเลคตินที่ไม่ต้องการแคลเซียมไอออนในการเกิดปฏิกิริยาของ CRD แต่จับกับสารประกอบคาร์โบไฮเดรตได้เมื่ออยู่ในภาวะที่มีหมู่ไฮดรอกซิล ซึ่งมักจับจำเพาะกับน้ำตาลแลคโตส (lactose) โอลิโกแซคคาไรด์และไกลโคคอนจูเกต (glycoconjugate) อื่น ๆ ที่มีหน่วยเบตา-กาแลคโตส ( $\beta$ -galactose) เป็นองค์ประกอบ (Drickamer, 1988; Elola and Fink, 1996) เลคตินชนิด S จึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า กาเลคติน (galectin) กาเลคตินเป็นโปรตีนที่ละลาย (soluble protein) อยู่ในของเหลวในเซลล์ (intracellular fluid) และของเหลวนอกเซลล์ เลคตินชนิด S มักพบในสัตว์มีกระดูกสันหลังและอาจพบในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังบางชนิด เช่น เลคตินจากฟองน้ำทะเล (*Geodia cydonium*) เลคตินจากหนอนตัวกลม (*Caenorhabditis elegans*) และเลคตินจากเพรียงหัวหอม (tunicate, *Clavelina picta*) และสามารถพบเลคตินชนิด S ได้ในกุ้งลายเสือ (Shi et al., 2014)

### 3.3 เลคตินในสัตว์มีกระดูกสันหลัง

เลคตินในสัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่น ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ส่วนใหญ่พบทั้งชนิดที่ต้องการและไม่ต้องการไดวาเลนต์แคทไอออน (divalent cation) ในการจับกับคาร์โบไฮเดรต พบได้ทั้งในรูปสารละลายและที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์เมมเบรน จะแตกต่างกันที่ขนาดโมเลกุลและความจำเพาะต่อน้ำตาล ซึ่งสามารถพบในสัตว์ต่างชนิดกัน และยังพบได้ในเนื้อเยื่อชนิดเดียวกันของสัตว์ต่างชนิดกัน จากการศึกษาเลคตินในสัตว์มีกระดูกสันหลัง พบคอลเลคติน (collectin) ซึ่งเป็นเลคตินชนิด C ที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีลักษณะเด่นคือมีส่วนที่มีโครงสร้างคล้ายคอลลาเจน (collagen) อยู่ภายในโมเลกุล จึงเรียกว่า collagen-like lectin คอลเลคตินพบได้จาก 2 แหล่งคือ คอลเลคตินที่พบในซีรัม ได้แก่ mannose-binding lectin (MBL) หรือ mannan-binding protein (MBP), collectin-43 (CL-43), collectin-46 (CL-46), collectin-L1 (CL-L1), คอนกลูตินิน (conglutinin), และพีโคลิน อีกแหล่งคือคอลเลคตินที่ถูกสังเคราะห์ในปอดเรียก surfactant protein (SP) มี 2 ชนิดคือ SP-A และ SP-D (Jensen et al., 2007)

คอลเลคตินชนิด MBL เป็นเลคตินที่พบในซีรัมและเนื้อเยื่อปอดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด (Raley et al., 1991) ถูกนำมาศึกษาอย่างกว้างขวาง เนื่องจากเป็นโปรตีนที่สามารถจดจำรูปแบบจำเพาะได้ ทำให้มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันโดยจดจำน้ำตาลบางชนิดบนผิวเซลล์ของเชื้อก่อโรคได้ MBL ประกอบด้วยหลายหน่วยย่อย แต่ละหน่วยย่อยเป็นสายโพลีเปปไทด์ จำนวน 3 สาย พันเป็นเกลียว แต่ละสายถูกแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ดังแสดงในรูปที่ 5 ได้แก่ ส่วนปลายด้านอะมิโน (N-terminal end) ประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสเทอีน (cystein) เป็นส่วนใหญ่ ส่วนกลางเป็นส่วนที่คล้ายกับคอลลาเจนประกอบด้วยกรดอะมิโนไกลซีน (glycine) ต่อกับกรดอะมิโนอื่นอีก 2 ชนิด ที่เรียงต่อกันซ้ำ ๆ ส่วนนี้สามารถจับกับเอนไซม์ serine protease

(MBL-associated serine proteases, MASPs) นำไปสู่การกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยกลไกอื่นๆ ในระบบภูมิคุ้มกันต่อไป และส่วนปลายคาร์บอกซิลิก (carboxylic end) เป็นตำแหน่งของ CRD ที่ขดเป็นวงกลม เลคตินชนิดนี้มีความจำเพาะต่อน้ำตาลแมนโนส (mannose), เอ็น-อะซิติก-ดี-กลูโคซามีน (N-acetyl-D-glucosamin, NAcGlc), เอ็น-อะซิติกแมนโนซามีน (N-acetyl mannosamine, NAcMan), กลูโคส (glucose), ฟรุคโตส (fructose) แต่มีความจำเพาะน้อยต่อน้ำตาลกาแลคโตส (galactose) และกรดไซอะลิก

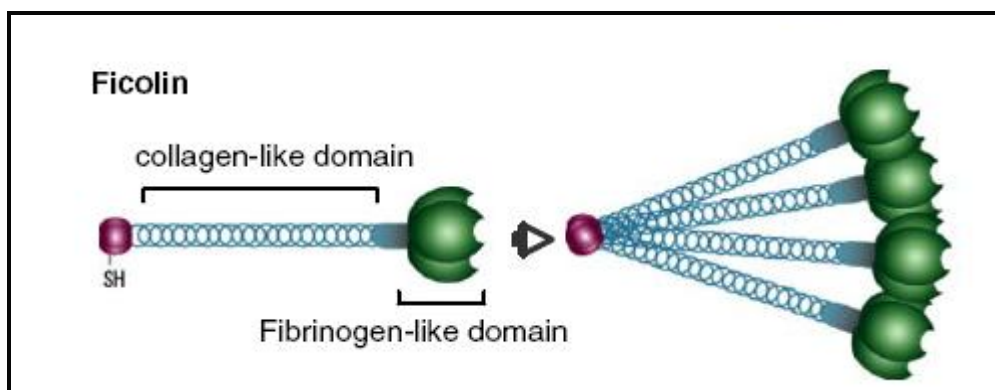


รูปที่ 5 โดเมนและโครงสร้างของ MBL (Endo *et al.*, 2006)

MBL, mannose-binding lectin; CRD, carbohydrate recognition domain

ส่วนฟิโคลินเป็นคอลเลคตินอีกชนิดที่มีลักษณะคล้าย MBL นอกจากมีโครงสร้างส่วนที่คล้ายคอลลาเจนแล้วยังมีส่วนที่คล้ายไฟบริโนเจน เรียกบริเวณนั้นว่า fibrinogen-like domain ฟิโคลินมีโครงสร้างด้านปลายอะมิโน และโครงสร้างส่วนกลางเหมือนกับ MBL จะต่างกันที่ปลายคาร์บอกซิลิกของฟิโคลินเป็นโดเมนคล้ายไฟบริโนเจน ขดม้วนเป็นทรงกลม ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับ CRD ใน MBL ดังแสดงในรูปที่ 6 ฟิโคลินพบในหลายเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Endo *et al.*, 2006; 2007) ในซีรัมมนุษย์ถูกแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ L-ficolin และ H-ficolin ฟิโคลินทั้ง 2 ชนิด สามารถจับจำเพาะกับเอ็น-อะซิติก-ดี-กลูโคซามีน และสามารถจับกับตัวรับจำเพาะของเอนไซม์ MASPs เพื่อนำไปสู่การย่อยทำลายสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุกได้ นอกจากนี้ยังพบฟิโคลินชนิด M-ficolin ซึ่งไม่ได้พบในซีรัม (non-serum lectin) แต่พบในเม็ดเลือด leukocyte โดยจับจำเพาะกับเอนไซม์ MASPs เพื่อนำไปสู่วิถีเลคตินต่อไป (Endo *et al.*, 2006; 2007)

ส่วนเลคติน SP-A และ SP-D ซึ่งถูกสังเคราะห์ที่ปอด ส่วนใหญ่ทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันโดยทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการกำจัดเชื้อโรค เลคติน SP-A สามารถจับจำเพาะกับน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตสและแลคโตสได้ ส่วนเลคตินชนิด SP-D มีความจำเพาะต่อน้ำตาลมอลโตส (maltose) (Ding *et al.*, 2004)



รูปที่ 6 โดเมนและโครงสร้างของ Ficolin (Endo *et al.*, 2006)

### 3.4 เลคตินที่พบในสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง

เลคตินที่พบส่วนใหญ่อยู่ในไฟลัมอาร์โธรพอด (arthropod) ได้แก่ กุ้ง (cominetti *et al.*, 2002) ปู (Umetsu *et al.*, 1991) และในไฟลัมมอลลัสก์ (mollusk) ได้แก่ หอย (Bulkagov *et al.*, 2004) ซึ่งจะพบได้ในฮีโมลิมฟ์ เมือก (mucus) น้ำในโพรงลำตัว (caelomic fluid) และเมมเบรนของเซลล์ซึ่งทำหน้าที่กำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย เนื่องจากวิธานิพนธ์ฉบับนี้เป็นการศึกษาในกุ้งขาวซึ่งเป็นสัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลังและมีเปลือกแข็งหุ้มภายนอก จึงนำเสนอข้อมูลของเลคตินในสัตว์ทะเลกลุ่มครัสเตเชียนต่าง ๆ เช่น กุ้ง ปู และหอย เป็นต้น

#### 3.4.1 เลคตินในกุ้ง

เลคตินในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนรวมถึงกุ้งสกุลพีเนียส ส่วนใหญ่จดจำและจับจำเพาะกับหมู่เอ็น-อะซิติก (N-acetyl group) และ โอ-อะซิติก (O-acetyl) ของกรดไซอะลิก กรดไซอะลิกพบบนผนังเซลล์ของสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ มักไม่พบในสัตว์ชั้นสูงรวมถึงสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนด้วย เลคตินในสัตว์กลุ่มนี้สามารถจับจำเพาะกับกรดไซอะลิก ซึ่งเกี่ยวข้องต่อการจดจำเพื่อป้องกันตนเองจากเซลล์บุกรุก เช่น เลคตินจากซีรัมของกุ้งกุลาดำจำเพาะกับกรดไซอะลิก สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหมู่เลือด O เกาะกลุ่ม เป็นเลคตินที่ต้องการ  $Ca^{2+}$  และทำให้แบคทีเรีย *Vibrio vulnificus* ที่ก่อโรคในกุ้งกุลาดำเกาะกลุ่มได้ (Ratanapo and Chulavatnatol, 1990; 1992) นอกจากนี้ ยังพบว่าเลคตินของกุ้งกุลาดำ สามารถทำให้แบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Micrococcus lysodeikticus* และแกรมลบบางชนิด เช่น *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila* และ *Vibrio alginolyticus* เกาะกลุ่มได้เป็นอย่างดี และส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งกุลาดำ ส่วนแบคทีเรียก่อโรค *Vibrio parahaemolyticus* เกิดการเกาะกลุ่มได้เพียงเล็กน้อย (Luo *et al.*, 2006) บ่งชี้ว่าเลคตินในกุ้งกุลาดำตอบสนองต่อการติดเชื้องก่อโรคและเป็นโปรตีนที่มีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง เลคตินจากกุ้งแชบ๊วยมีความจำเพาะกับกรดไซอะลิก หรือน้ำตาลที่มีหมู่เอ็น-อะซิติกเป็นองค์ประกอบ เช่น NAcMan,

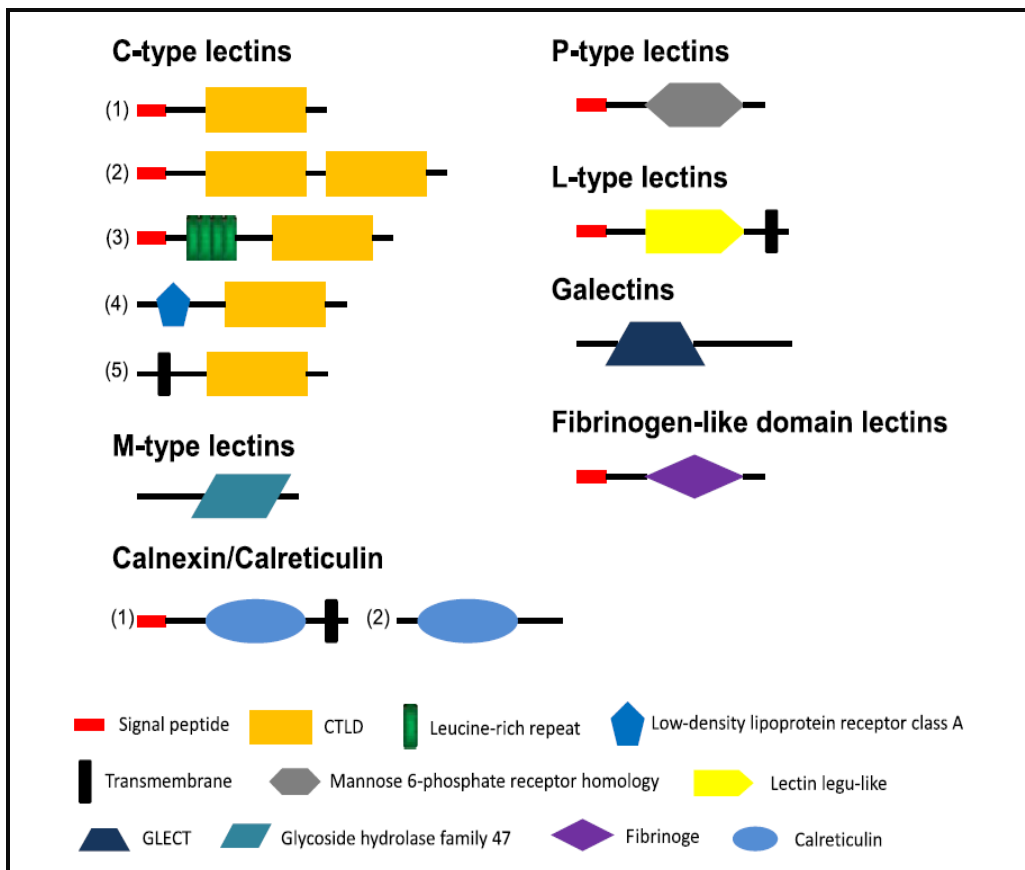
NAcGlc, เอ็น-อะซีติลกาแลคโตซามีน (N-acetyl galactosamine, NAcGal) และพบว่ากรดไซอะลิกสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระจายได้ดีที่สุด ส่วนมิวซินจากกระเพาะหมู (porcine stomach mucin) และฟีทูอิน (fetuin) สามารถยับยั้งแอกทิวิตีของเลคตินของกุ้งแชบ๊วยได้ดีเช่นกัน (Rittidach *et al.*, 2007; Utarabhand *et al.*, 2007) นอกจากนี้พบว่าเลคตินบริสุทธิ์จากกุ้งแชบ๊วยยังสามารถทำให้แบคทีเรียก่อโรค เช่น *V. harveyi* และ *V. parahemolyticus* เกาะกลุ่มได้เป็นอย่างดี ส่วน *V. vulnificus* สามารถทำให้เกิดการเกาะกลุ่มได้รองลงมา แต่ไม่ทำให้เชื้อไม่ก่อโรคในกุ้งแชบ๊วยได้แก่ *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi* และ *E. coli* เกาะกลุ่มได้อีกทั้งเลคตินบริสุทธิ์นี้มีน้ำหนัก 316.2 kDa และมีหน่วยย่อยขนาด 32.3 และ 30.9 kDa (Rittidach *et al.*, 2007) ส่วนเลคตินในกุ้งลายเสือ พบว่าเป็นเลคตินชนิด C สามารถทำให้เชื้อก่อโรคในกุ้งลายเสือ เช่น *V. parahemolyticus*, *A. hydrophila*, *V. alginolyticus* และ *M. lysodeikticus* เกิดการเกาะกลุ่มได้ (Yang *et al.*, 2007) นอกจากนี้กุ้งสกุลพีเนียสยังพบเลคตินบริสุทธิ์จากฮีโมลิมพ์ของกุ้งก้ามกราม มีความจำเพาะต่อกรดไซอะลิก และเมื่อทำให้เลคตินบริสุทธิ์พบว่ามีย่านน้ำหนักโมเลกุล 19 kDa (Vazquez *et al.*, 1993) นอกจากนี้พบเลคตินอีกชนิดในกุ้งชนิดเดียวกัน สามารถจับจำเพาะกับน้ำตาลที่มีหมู่อะซีติลเป็นองค์ประกอบ และสามารถทำให้แบคทีเรียบางชนิดเกาะกลุ่มได้เช่น *Pasteurella haemolytica*, *Bacillus cereus* และ *Aeromona* spp. (Vazquez *et al.*, 1994) ต่อมา Zenteno และคณะ (2000) รายงานการพบเลคตินในกุ้งก้ามกรามอีกชนิด โดยพบว่าสามารถจับจำเพาะกับน้ำตาลที่มีหมู่อะซีติลเป็นองค์ประกอบได้เช่นเดียวกัน และยังพบว่าเลคตินชนิดนี้สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงต่าง ๆ เกิดการเกาะกลุ่มได้ เลคตินของกุ้ง *Litopenaeus schmitti* เป็นเลคตินชนิด C มีความจำเพาะกับน้ำตาลที่มีหมู่อะซีติลเป็นองค์ประกอบ คือ กรดเอ็น-อะซีติลนิวรามินิก (N-acetyl neuraminic acid, NAcNeu), O-sialoglycoconjugate, มิวซินจากวัว และฟีทูอิน และสามารถจดจำลิโปโพลีแซคคาไรด์หลายชนิดอีกทั้งเลคตินบริสุทธิ์ชนิดนี้มีน้ำหนักโมเลกุลรวม 220 kDa ประกอบด้วยหน่วยย่อยขนาด 31 และ 34 kDa (Cominetti *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังพบเลคตินบริสุทธิ์จากฮีโมลิมพ์ของกุ้ง *Litopenaeus setiferus* มีขนาดโมเลกุล 291 kDa และประกอบด้วยหน่วยย่อยขนาด 80 และ 52 kDa มีความจำเพาะกับกรดไซอะลิกและน้ำตาล NAcGlc, NAcGal, มิวซินจากวัว และฟีทูอิน (Alpuche *et al.*, 2005) บ่งชี้ว่าเลคตินในกุ้งกุลาดำ กุ้งแชบ๊วย กุ้งลายเสือ กุ้งก้ามกราม และกุ้งขาวตอบสนองต่อการติดเชื้องูโรคและเป็นโปรตีนที่มีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง

ในกุ้งมีรายงานการศึกษาเลคติน 7 ชนิด คือ เลคตินชนิด C, เลคตินชนิด S, เลคตินชนิด P, เลคตินชนิด L (L-type lectin), เลคตินชนิด M (M-type lectin) และ calnexin หรือ calreticulin (Wang and Wang, 2013) ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งเลคตินที่พบในกุ้งมีโครงสร้างที่แตกต่างกันขึ้นกับชนิดของเลคติน ดังรูปที่ 7

ตารางที่ 1 ชนิดของเลคตินที่มีรายงานในกุ่มชนิดต่าง ๆ

ชนิดของเลคติน	โดเมนที่พบ	หน้าที่
C-type lectins	carbohydrate recognition domain CRD (calcium-dependent)	pattern recognition, opsonin, antivirus and antibacteria
S-type lectins (Galectins)	carbohydrate recognition domain CRD (thiol-dependent)	opsonin and promote phagocytosis
P-type lectins	mannose 6-phosphate receptor homology (MRH)	protein sorting
L-type lectins	luminal carbohydrate recognition domain (LCRD)	glycoprotein sorting, trafficking and targeting
M-type lectins	glycoside hydrolase family 47 (GH47)	endoplasmic reticulum- associated degradation of glycoprotein
Calnexin/ Calreticulin	calreticulin	calcium signal transduction and calcium storage
Fibrinogen-like domain lectins	fibrinogen-related domain (FReD)	pattern recognition, phagocytosis induction and antibacterial





รูปที่ 7 โครงสร้างของเลคตินชนิดต่างๆ ที่พบในกุ้ง (Wang and Wang, 2013)

### 3.4.2 เลคตินในหอย

จากการศึกษาของ Takagi และคณะ (1994) ในหอยสองฝา *Mytilus edulis* พบเลคติน 3 ชนิด คือ M3, M6 และ M7 ที่จำเพาะกับอะไซอะโลเฟทิน (asialofetuin) ในภาวะที่มี  $Ca^{2+}$  โดยพบว่า M6 และ M7 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 180 หน่วย และมีลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายกัน 76% ส่วน M3 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 149 หน่วย และมีลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายกับของ M6 และ M7 26% นอกจากนี้พบว่ากรดอะมิโน 50% ทางด้านปลายคาร์บอกซิลิกของเลคตินทั้ง 3 ชนิดเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนใน CRD ของเลคตินชนิด C ที่พบในสัตว์ชนิดอื่นๆ เลคตินจากฮีโมลิฟของหอยนางรม *Crassostrea gigas* และหอย horse-mussel (*Modiolus modiolus*) ทำให้เม็ดเลือดแดงของคนและสัตว์หลายชนิด รวมทั้งแบคทีเรียหลายชนิดเกาะกลุ่มได้ จัดเป็นเลคตินชนิด C-reactive protein เลคตินจากฮีโมลิฟของหอยมุก (pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*) มีขนาดโมเลกุล 440 kDa ประกอบด้วย 22 หน่วยย่อยขนาด 20 kDa มีความจำเพาะกับน้ำตาลกาแลคโตสและ NAcGal (Suzuki and Mori, 1989) นอกจากนี้พบเลคตินในหอยก้ามมะนิลา (Manila clam, *Ruditapes philippinarum*) เป็นเลคตินที่สามารถจับจำเพาะกับ hypnosporin บริสุทธิ์ของเชื้อโปรโตซัว *Perkinsus* spp. ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในหอย

ชนิดนี้ได้ และเลคตินที่ทำให้บริสุทธิ์จากหอยชนิดนี้มีมวลโมเลกุล 138 kDa มี 3 หน่วยย่อยคือ 74, 34 และ 30 kDa และเป็นเลคตินชนิด C ที่มีความจำเพาะกับน้ำตาล NAcGal มิวซิน (mucin) และเลือดคนหมู่มาก (Bulgakov *et al.*, 2004)

### 3.4.3 เลคตินในปู

เลคตินในฮีโมลิมพ์ของปูม้า (blue crab, *Scylla serrata*) เป็นเลคตินที่จำเพาะกับ NAcNeu และสามารถเร่งการทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายได้ (Mercy and Ravindranath, 1994) เลคตินที่สกัดจากไข่ระยะเอ็มบริโอ (embryonated egg) ของปู *Emerita asiatica* เป็นไกลโคโปรตีนที่จำเพาะต่อมิวซิน (mucin-type glycoprotein) ที่จับอยู่กับแคโรทีนอยด์ (carotenoid) เป็นเลคตินกลุ่มใหม่ที่อาจมีบทบาทเกี่ยวข้องในการนำไวเทลโลจีนิน (vitellogenin) เข้าสู่เซลล์ไข่ (Devaraj *et al.*, 1995) เลคตินในปูชน (Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*) เป็นเลคตินที่พบในฮีโมไซท์ เลคตินชนิดนี้มีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นเมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยแบคทีเรียแกรมลบ *A. hydrophila* บ่งชี้ได้ว่าเลคตินในปูชนมีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน (Zhang *et al.*, 2011) นอกจากนี้ Guo และคณะ (2011) ได้ค้นพบเลคตินในปูชนอีก 2 ชนิด คือ EsCTLDCp-1 และ EsCTLDCp-2 โดยพบว่าเลคตินทั้งสองชนิดมีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นเมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยแบคทีเรียแกรมลบ *A. hydrophila* เช่นเดียวกับเลคตินที่ค้นพบมาก่อนหน้านี้

### 3.4.4 เลคตินในแมงดาทะเล

เลคตินจากฮีโมลิมพ์ของแมงดาทะเล *Limulus polyphemus* เป็นเลคตินที่สามารถจับจำเพาะกับน้ำตาล N-acetyl hexosamine และพบว่าเลคตินชนิดนี้มีมวลโมเลกุลรวม 170 kDa ประกอบด้วย 24 หน่วยย่อยที่มีขนาด 70 kDa (Tsuboi *et al.*, 1996) จากการศึกษาของ Gokudan และคณะ (1999) พบเลคตินในฮีโมลิมพ์ของแมงดาทะเล (horseshoe crab, *Tachypleus tridentatus*) ซึ่งให้ชื่อว่า tachylectins 5A และ 5B (TLs-5) สามารถทำให้เม็ดเลือดคน รวมถึงแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบบางชนิดเกาะกลุ่มได้ และพบว่ามีความจำเพาะต่อโมเลกุลที่มีหมู่เอ็น-อะซิติลเป็นองค์ประกอบ แมงดาทะเลชนิดนี้สามารถหลั่งโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนออกมาในฮีโมลิมพ์ ซึ่งทำหน้าที่เสมือนเลคตินที่สามารถจดจำสิ่งแปลกปลอมที่ไม่ใช่เซลล์เจ้าบ้านได้ (nonself-recognizing lectin) นอกจากนี้ยังพบเลคตินที่จับจำเพาะกับกรดไซอะลิก (sialic acid-binding lectin) ซึ่งเป็นไกลโคโปรตีนในแมงดาทะเลชนิดนี้ด้วย

#### 4. บทบาททางชีวภาพของเลคตินในสัตว์

เลคตินในสัตว์แต่ละชนิดมีความหลากหลายของโครงสร้าง โดยพบว่าอาจมีทั้งเลคตินที่เป็นส่วนของเมมเบรน (integral membrane lectin) และเลคตินที่อยู่ในรูปสารละลาย (soluble lectin) เลคตินในสัตว์แต่ละชนิดมีบทบาททางชีวภาพที่ต่างกัน โดยส่วนมากมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเอง

##### 4.1 บทบาทของเลคตินในสัตว์มีกระดูกสันหลัง

เลคตินในสัตว์มีกระดูกสันหลังเป็นเลคตินที่มีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกัน เลคตินในสัตว์กลุ่มนี้มีหลากหลายชนิดที่เป็นที่รู้จักได้แก่ คอลเลคติน เลคตินชนิดนี้สามารถจดจำและจับกับคาร์โบไฮเดรตที่เป็นตัวรับจำเพาะบนผิวเซลล์สิ่งแปลกปลอม เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ พาราไซต์ รวมถึงไวรัสบางชนิด การจับจำเพาะดังกล่าวนำไปสู่การยับยั้งและการทำลายโดยกระบวนการต่างๆ อาจเกี่ยวข้องกับแอนติบอดี เอนไซม์หรือสารชีวเคมีอื่น ๆ ที่มีหน้าที่ต่อต้านสิ่งแปลกปลอม กระตุ้นให้เกิดกระบวนการป้องกันตนเองจากเชื้อโรคต่างๆ ได้ เช่น กระตุ้นให้เกิดฟาโกไซโทซิส และออปโซไนซ์ เป็นต้น (Ding *et al.*, 2004) คอลเลคตินชนิด SP-D ทำหน้าที่เป็นตัวกลางระหว่างระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ และระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ซึ่งเลคตินเป็นโปรตีนที่สำคัญชนิดหนึ่งในระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ โดยคอลเลคติน SP-D จดจำคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ด้วยตำแหน่ง CRD และกระตุ้นให้เกิดฟาโกไซโทซิส และกระบวนการต่างๆ ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ส่วนคอลเลคตินชนิด MBL เป็นเลคตินที่พบในซีรัมและเนื้อเยื่อของคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมหลายชนิด โดยเลคตินชนิดนี้สามารถทำให้แบคทีเรีย รา ยีสต์ โปรโตซัว รวมถึงไวรัสบางชนิดเกาะกลุ่มได้ (Turner, 2003)

##### 4.2 บทบาทของเลคตินในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

บทบาทและหน้าที่ของเลคตินในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง มีการศึกษาน้อยมาก โดยเลคตินในกลุ่มนี้เป็นเลคตินที่อยู่ในรูปของเหลวภายในเซลล์ โดยแยกบทบาททางชีวภาพของเลคตินในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังออกได้เป็น 2 ด้าน คือ บทบาทที่ไม่เกี่ยวข้องและเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเอง สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังรวมทั้งสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน เช่น กุ้งแชบ๊วย กุ้งกุลาดำ กุ้งขาวและกุ้งชนิดต่าง ๆ ไม่มีระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ดังนั้นการป้องกันตนเองจากเชื้อโรคมายังระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (Loker *et al.*, 2004)

เลคตินทำหน้าที่เป็น PRPs โดยทำงานผ่านการจับจำเพาะระหว่างตัวมันเองกับองค์ประกอบที่เป็นคาร์โบไฮเดรตซึ่งอยู่บนผิวเซลล์ของผู้บุกรุก เลคตินที่พบส่วนใหญ่จัดเป็นแบบ C ซึ่งต้องการ  $Ca^{2+}$  ในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงหรือจุลินทรีย์ และมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเอง อาทิเช่น การพบเลคตินโมนอดิน (monodin) จากซีรัม (serum) ของกุ้งกุลาดำที่ทำให้แบคทีเรีย *V. vulnificus* ที่ก่อโรคในกุ้งกุลาดำเกาะกลุ่มได้ และพบระดับเลคตินเพิ่มขึ้นในฮีโมลิม์ฟหลังจากการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ (Ratanapo and Chulavatnatol, 1990; 1992) ในกุ้งแชบ๊วย (นิชา ไพจิตร, 2545; Rittidach, 2006) มีรายงานการพบเลคตินแบบ C ที่มี

ความจำเพาะต่อกรดไขมันในฮีโมลิมพ์ของกุ้งแชบ๊วยซึ่งสามารถทำให้แบคทีเรียก่อโรค เช่น *V. harveyi* เกาะกลุ่มได้ แต่ไม่ทำให้เชื้อไม่ก่อโรคในกุ้งเกิดการเกาะกลุ่ม และยังพบว่าระดับเลคตินในฮีโมลิมพ์มีระดับเพิ่มสูงขึ้นตอบสนองต่อการติดเชื้อก่อโรค *V. harveyi* (Rittidach *et al.*, 2007; Utarabhand *et al.*, 2007) ต่อมาจึมีรายงานการพบเลคตินแบบ C ที่มีความจำเพาะต่อกรดไขมันในฮีโมลิมพ์ของกุ้งขาว ซึ่งสามารถทำให้แบคทีเรียก่อโรค *V. anguillarum* เกาะกลุ่มได้ แต่ไม่ทำให้เชื้อไม่ก่อโรค *Streptococcus iniae* เกาะกลุ่ม บ่งชี้ว่าเลคตินมีบทบาทสำคัญในกลไกการตอบสนองต่อเชื้อก่อโรค (Sun *et al.*, 2007)

ในปัจจุบันมีรายงานการศึกษายีนของเลคตินในกุ้งสกุลพีเนียส 5 ชนิด ซึ่งเป็นแบบ C ในกุ้งกุลาดำมีรายงานยีนเลคตินแบบ C ที่มี CRD ทั้ง 1 และ 2 โดเมน อยู่ในโครงสร้าง (Luo *et al.*, 2003; 2006; Ma *et al.*, 2008) ในทำนองเดียวกับกุ้งขาวจีน (Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*) ที่พบยีนเลคตินแบบ C ที่มี CRD ทั้ง 1 และ 2 โดเมน (Liu *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009a, b; Zhang *et al.*, 2009a) และยีนเลคตินของกุ้งแชบ๊วย 1 ยีน ซึ่งประกอบด้วย CRD 2 โดเมน (Rattanaporn and Utarabhand, 2011) ในขณะที่ในกุ้งลายเสือพบยีนเลคตินที่ประกอบด้วย CRD 1 โดเมน เท่านั้น (Song *et al.*, 2010) ส่วนยีนเลคตินที่มีรายงานในกุ้งขาวมี CRD ทั้ง 1 และ 2 โดเมน (Ma *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009b; Zhao *et al.*, 2009; Junkunlo *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2012) (ตารางที่ 2) จากข้อมูลข้างต้นพบว่าเลคตินที่มีการศึกษาในกุ้งส่วนใหญ่เป็นกลุ่มของเลคตินที่มีโครงสร้างประกอบด้วย CRD ต่อมาจึมีการค้นพบเลคตินที่มีโครงสร้างแตกต่างจากเลคตินที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ในกุ้งสกุลพีเนียส ซึ่งเป็นเลคตินที่มีโครงสร้างประกอบด้วย fibrinogen-related domain (FReD) ซึ่งบทบาทของเลคตินที่มี FReD ภายในโครงสร้างมีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์มีกระดูกสันหลัง แต่อย่างไรก็ตามบทบาทหน้าที่ของโปรตีนชนิดนี้ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังยังไม่เป็นที่ทราบมากนัก

ตารางที่ 2 คุณลักษณะของเลคตินชนิดต่าง ๆ ในกุ้งสกุลพีเนียส 5 ชนิด

Species	Name	CRD	Length of CRD	Ca <sup>2+</sup> -binding site 2	References
<i>F. chinensis</i>	FcLec1	1	131	EPN, WYD	Sun <i>et al.</i> , 2008
	FcLec2	2	134, 134	QPD, MND EPN, FRD	Zhang <i>et al.</i> , 2009a
	FcLec3	1	130	EPS, FAD	Wang <i>et al.</i> , 2009a
	FcLec4	1	174	QPD, WHD	Wang <i>et al.</i> , 2009b
	FcLec5	2	134, 134	QPD, LND EPQ, FRD	Xu <i>et al.</i> , 2010
	FcLec6	1	144	QPD, WHD	ไม่ถูกเผยแพร่
	Fclectin	2	123, 123	QPD, VND QPD, VND	Liu <i>et al.</i> , 2007
<i>P. monodon</i>	PmLT	2	134, 134	QPD, MND EPN, FRD	Ma <i>et al.</i> , 2008
	PmLec	1	123	QPD, LND	Luo <i>et al.</i> , 2006
	PMAV	1	134	QPD, IHD	Luo <i>et al.</i> , 2003
<i>L. vannamei</i>	LvLT	2	134, 136	QPD, MND EPD, FRD	Ma <i>et al.</i> , 2007
	LvLec	1	131	EPD, WYD	Zhang <i>et al.</i> , 2009b

ตารางที่ 2 คุณลักษณะของเลคตินชนิดต่าง ๆ ในกุ้งสกุลพีเนียส 5 ชนิด (ต่อ)

Species	Name	CRD	Length of CRD	Ca <sup>2+</sup> -binding site 2	References
<i>L. vannamei</i>	LvLectin1	1	137	QPD, -	Wei <i>et al.</i> , 2012
	LvLectin2	1	134	QPN, -	Wei <i>et al.</i> , 2012
	LvCTL	2	134, 136	QPD, MAD GTR, F(L)RD	Costa <i>et al.</i> , 2011
	LvCTL1	1	131	EPN, WYD	Zhao <i>et al.</i> , 2009
	LvCTLD	1	159	QAP, -	Junkunlo <i>et al.</i> , 2012
<i>M. japonicus</i>	MjLecA	1	-	EPS, FND	Song <i>et al.</i> , 2010
	MjLecB	1	133	QPT, FND	Song <i>et al.</i> , 2010
	MjLecC	1	135	QPN, FHS	Song <i>et al.</i> , 2010
	MjLecD	1	132	QPD, LTD	ไม่ถูกเผยแพร่
	MjLecE	1	131	EPN, WYD	ไม่ถูกเผยแพร่
	MjLec1	1	-	-, FDD	Wang and Wang, 2013
	MjLec2	1	-	-, -	Wang and Wang, 2013
	MjLec3	1	-	-, -	Wang and Wang, 2013
<i>F. merguensis</i>	FmLC	2	134, 134	QPD, MND EPN, FRD	Rattanaporn and Utarabhand, 2011

- คือ ไม่มีการตรวจพบ

## 5. โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจน (Fibrinogen-related protein, FReP)

โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจน หรือ Fibrinogen-related protein (FReP) เป็นไกลโคโปรตีน ที่มี FReD อยู่ภายในโครงสร้าง มีคุณสมบัติเป็นเลคติน สามารถพบได้ทั้งในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง FReP เป็นโปรตีนที่จัดอยู่ในกลุ่ม PRPs เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน โดยพบว่าโครงสร้าง FReD ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 200 หน่วย ซึ่งเป็นโดเมนที่มีการอนุรักษ์สูงมีส่วนคล้ายกับลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลายคาร์บอกซิลิก (C-terminal amino acid sequence) ของ tenascin, ฟิโคลิน, angiopoietin, ไฟบริโนเจนสาย  $\beta$  และ  $\gamma$  (fibrinogen  $\beta$  and  $\gamma$  chains) แต่แตกต่างกันทางด้านปลายอะมิโน (Adema *et al.*, 1997; Lu and Le, 1998; Zhang *et al.*, 2001b) FReP ถูกพบครั้งแรกในปลิงทะเล (sea cucumber) และพบในสิ่งมีชีวิตอีกหลายชนิดในเวลาต่อมา จากรายงานพบว่า การแสดงออกของ FReP จะเพิ่มขึ้นหลังถูกกระตุ้นด้วยจุลินทรีย์หรือสารที่เป็นองค์ประกอบของจุลินทรีย์ (Pathogen-associated compound) (Ramirez-Gomez *et al.*, 2009; Gorbushin and Lakovleva, 2011; Wang *et al.*, 2004; Kurachi *et al.*, 1998; Rego *et al.*, 2005) จากการเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของ FReP ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด บ่งชี้ว่า FReP มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน ในปัจจุบันทราบแน่ชัดว่า FReP ที่พบในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังมีคุณสมบัติเป็นเลคตินและสามารถทำให้แบคทีเรียเกิดการเกาะกลุ่มได้ ดังเช่น เลคตินที่พบในแมงดาทะเล ชื่อ tachylectin เป็นเลคตินที่ถูกทำบริสุทธิ์จากพลาสมาของแมงดาทะเลและภายในโครงสร้างประกอบด้วย FReD ซึ่งมีความเหมือนกับฟิโคลินของคน (human ficolin) มีความสามารถในการจดจำโมเลกุลที่มีหมู่อะซิติกเป็นองค์ประกอบและสามารถทำให้เกิดการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของคน (human erythrocyte) แบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบได้ (Gokudan *et al.*, 1999) ต่อมามีการค้นพบ FReP อีกสองชนิด ในเห็บ *Ornithodoros moubata* ซึ่งมีชื่อว่า Dorin M (Rego *et al.*, 2006) และในหมัด *Ixodes ricinus* มีชื่อว่า Ixodes (Rego *et al.*, 2005) นอกจากนี้ยังพบ FReP ในหอยเชลล์ bay scallop *Argopecten irradians* ชื่อ Ai-FREP1 มีคุณสมบัติทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของไก่ คน แบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ เช่นเดียวกับที่พบในแมงดาทะเล และระดับการแสดงออกของยีนนี้ในหอยเชลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรียแกรมลบมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหลังจากถูกกระตุ้น แต่ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรียแกรมบวก (Zhang *et al.*, 2009c) ต่อมา Yang และคณะ (2014) ได้ค้นพบ FReP อีกหนึ่งชนิดจากหอยเชลล์ ชื่อ Ai-FREP2 จากการศึกษาการแสดงออกของยีนนี้พบว่า จะเพิ่มขึ้นหลังถูกกระตุ้นด้วยลิโปลิแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide), เปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) และเบตา-กลูแคน ( $\beta$ -glucan) โดยพบว่าโปรตีนชนิดนี้ยังสามารถจับจำเพาะกับแบคทีเรียแกรมลบ *V. anguillarum* และแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* และ มีคุณสมบัติทำให้เกิดการเกาะกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ และแบคทีเรียแกรมบวก นอกจากนี้ยังพบ FReP ในหอยทากและยุง ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการ

ตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดต่อเชื้อก่อโรค ตัวอย่างเช่น ในหอยทาก snail *Biomphalaria glabrata* พบว่า FReP ถูกผลิตเพิ่มขึ้นในระบบไหลเวียนเลือดเมื่อถูกกระตุ้นด้วย พาราไซท์ และโปรตีนดังกล่าวยังมีคุณสมบัติช่วยให้มีการตกตะกอนของแอนติเจนที่ละลายมาจาก trematodes (Adema et al., 1997) ในยุง mosquito *Armigeres subalbatus* พบ FReP ชนิดหนึ่ง ที่มีชื่อว่า aslectin จากรายงานพบว่าปริมาณของโปรตีนชนิดนี้เพิ่มขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรีย และมีความสามารถในการจับกับแบคทีเรีย *E. coli* และ *Micrococcus luteus* (Wang et al., 2004) จากรายงานดังกล่าวทำให้ทราบว่า FReP ที่มีการค้นพบแล้วล้วนมีบทบาทสำคัญในระบบ ภูมิคุ้มกันของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

Söderhäll และคณะ (2009) ได้ค้นพบโปรตีนที่มีคุณสมบัติยับยั้งกระบวนการ สร้างเมลานิน (melanization inhibition protein, PIMIP) ในฮีโมลิฟของกุ้งนาง (*Pacifastacus leniusculus*) โดยพบว่าภายในโครงสร้างของ PIMIP ประกอบด้วย FReD ซึ่งจะคล้ายกับ แอล-ฟีโคลิน ที่พบในสัตว์มีกระดูกสันหลัง และยังพบบริเวณที่มีกรดอะมิโนแอสปาร์ติกมาก (Asp-rich region) ซึ่งคล้ายกับโครงสร้างที่พบในฟีโคลิน ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความเกี่ยวข้องกับการ จับกับแคลเซียม อย่างไรก็ตาม PIMIP ไม่สามารถทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเซลล์แบคทีเรียได้ ต่อมา Angthong และคณะ (2010) ได้ค้นพบโปรตีนชนิดเดียวกันในกุ้งกุลาดำ ที่มีชื่อว่า PmMIP ซึ่งโปรตีนชนิดนี้มีความสำคัญในการป้องกันตนเองจากผู้บุกรุก จากการศึกษาพบว่าภายใน โครงสร้างของโปรตีนประกอบด้วย FReD 1 โดเมน ต่อมา Wu และคณะ (2011) ได้ค้นพบ โปรตีนชนิดใหม่ 2 ชนิดที่มีโครงสร้างคล้ายกับฟีโคลิน (ficolin-like proteins, FLP) ซึ่งทำหน้าที่ เป็น PRPs จดจำจุลินทรีย์บุกรุกในกุ้งนาง โดยอาศัยเทคนิค two-dimensional electrophoresis และ mass spectroscopy โครงสร้างของโปรตีนที่ค้นพบใหม่นี้ประกอบด้วย FReD อยู่ทางด้าน ปลายคาร์บอกซิลิก และบริเวณที่มีกรดอะมิโนซ้ำกัน (repeat region) อยู่ทางด้านปลายอะมิโน ซึ่ง มีส่วนคล้ายคลึงกับโดเมนคล้ายคอลลาเจน (collagen-like domain) จากรายงานการสร้างโปรตีน ลูกผสม (recombinant protein) ของ FLP พบว่าโปรตีนลูกผสมที่สร้างได้สามารถทำให้เกิดการ เกาะกลุ่มของแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* และ *A. hydrophila* ในสภาวะที่มีแคลเซียม และเมื่อนำ แบคทีเรียไปเคลือบด้วย FLP แล้วนำไปบ่มกับเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งนาง พบว่าอัตราการตายของ เซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม จากผลการทดลองทำให้ทราบว่า FLP ทำหน้าที่เป็น PRPs ใน ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งนาง และเมื่อไม่นานมานี้ Chai และคณะ (2012) ได้ค้นพบ FReP จากกุ้ง ปลายเสื้อที่มีชื่อว่า MjFREP1 มีความยาว 270 กรดอะมิโน ประกอบด้วย FReD 1 โดเมนที่มีความ ยาว 223 กรดอะมิโน ผลจากการศึกษาด้วยเทคนิค real-time PCR พบการแสดงออกของยีนนี้ มากที่สุดในเหงือก (gill) และพบว่ารูปแบบการแสดงออกของยีนนี้จะเพิ่มขึ้นหลังจากถูกกระตุ้น ด้วยเชื้อ *V. anguillarum*, *S. aureus* หรือ WSSV และได้สร้างโปรตีนลูกผสมของ FReD ของ MjFREP1 สามารถทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus megaterium* และ *S. aureus* ในสภาวะที่มีแคลเซียม ยิ่งไปกว่านั้นพบว่า



โตนเมนต์กล่าวสามารถจับจำเพาะกับเปปทิโดไกลแคน ลิโปโพลีแซคคารไรด์ แบคทีเรีย และโปรตีน VP28 ของ WSSV อีกทั้ง Sun และคณะ (2014) ได้ค้นพบโปรตีน MjFREP2 จากกุ้งลายเสือ โดยพบว่ามีความยาว 317 กรดอะมิโน และประกอบด้วย FReD 1 โตนเมนต์ มีความยาว 201 กรดอะมิโน และจากการศึกษาการแสดงออกของยีนพบว่า MjFREP2 มีการแสดงออกในหลายเนื้อเยื่อ เช่น ฮีโมไซท์ หัวใจ (heart) ตับ (hepatopancreas) เหนืออก กระเพาะอาหาร (stomach) และลำไส้ (intestine) อีกทั้งยังพบว่ายีนนี้จะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นหลังถูกกระตุ้นด้วย *V. anguillarum* และ *S. aureus* และโปรตีนลูกผสมของ MjFREP2 สามารถทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ *V. anguillarum* ในสถานะที่มีแคลเซียม นอกจากนี้ยังสามารถจับจำเพาะกับแบคทีเรียและโพลีแซคคารไรด์ (polysaccharide) เมื่อเร็ว ๆ นี้ Zhang และคณะ (2014) พบเลคตินจากกุ้งก้ามกราม อีก 2 ชนิด ได้แก่ MrFico1 และ MrFico2 โดยพบว่า MrFico1 มีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นหลังเหนี่ยวนำด้วย *V. anguillarum* ในขณะที่ MrFico2 จะมีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเหนี่ยวนำด้วย *V. anguillarum* และ WSSV อีกทั้งพบว่าเลคตินทั้ง 2 ชนิด สามารถจับจำเพาะกับแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ และยังสามารถทำให้แบคทีเรียก่อโรค *V. parahaemolyticus* และ *A. hydrophila* เกิดการเกาะกลุ่มในสถานะที่มีแคลเซียม จะเห็นได้ว่าโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนมีบทบาทเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังทั้งสิ้น

จากรายงานเกี่ยวกับ FReP ยังมีน้อยมากในกุ้งชนิดต่าง ๆ และไม่พบรายงานในกุ้งขาว ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะโคลนยีนและศึกษาสมบัติของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนจากกุ้งขาว (LvFReP) เพื่อที่จะทำให้ทราบบทบาทของเลคตินชนิดนี้ในกุ้งขาวมากยิ่งขึ้น

## 6. โรคติดเชื้อไวรัส WSSV

ในปัจจุบันโรคติดเชื้อไวรัส WSSV ในกุ้งทะเลนับเป็นปัญหาต่อการเพาะเลี้ยงและส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจ แม้ว่าอัตราการตายจะรุนแรงน้อยกว่า YHV แต่การระบาดของโรคมักแพร่กระจายเป็นบริเวณกว้าง ซึ่งการระบาดของ WSSV เป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดความสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจเป็นอย่างมากในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย (ชะลอ ลิมสุวรรณ, 2543) นักวิจัยจึงได้พยายามคิดค้นหาแนวทางในการป้องกันการเกิดโรค

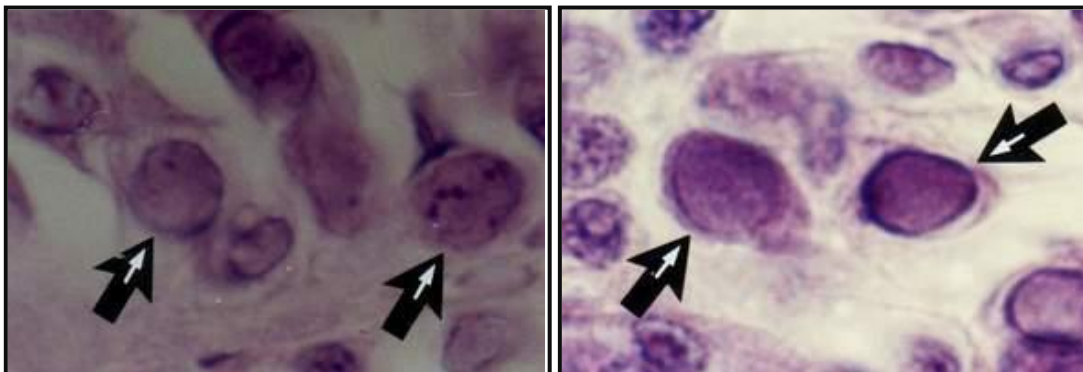
เชื้อไวรัส WSSV ก่อให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาว (รูปที่ 8-9) โดยกุ้งที่ได้รับเชื้อนี้จะถูกทำลายชั้น ectoderm และ mesoderm โดยจะพบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่ออย่างชัดเจน บริเวณเนื้อเยื่อผิวใต้เปลือก เหนืออก และอวัยวะสร้างเม็ดเลือด (lymphoid organ) โดยจะทำให้นิวเคลียสของเซลล์บวมโต บริเวณใต้เปลือกกุ้งตลอดทั้งตัวจะมีสีแดงเรื่อ ๆ ชมพูถึงเข้ม บางครั้งจะเป็นสีส้มและมีจุดขาวขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1-2 มิลลิเมตร โดยเฉพาะบริเวณส่วนหัวและด้านข้างลำตัวส่วนหาง เนื่องมาจากเกิดความผิดปกติของการสะสมแคลเซียมและฟอสฟอรัสที่ผิดปกติ (Lightner and Redman, 1996; ชะลอ ลิมสุวรรณ, 2543) บางครั้งกุ้งจะลอกคราบ

ไม่ได้หรือลอกคราบแล้วเปลือกไม่แข็ง กุ้งจะทยอยบอบบ่อเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ โดยที่ยังกินอาหารปกติ กุ้งจะมีอาการตัวแดง เปลือกนึ่ม บาง (ชะลอ ลี้มสุวรรณ, 2543) โดยเฉพาะส่วนหัวและบริเวณสันหลังตลอดแนวลำตัว มีสีแดงก่อนส่วนอื่น ประมาณ 3-4 วัน ต่อมาจะพบกุ้งที่มีอาการตัวแดง และกุ้งจะเริ่มกินอาหารน้อยลง และจะมีอัตราการตายสูงถึง 100% ภายในระยะเวลา 5-7 วัน หลังจากที่ได้รับเชื้อ (Wang *et al.*, 2000) ไวรัสนี้ก่อให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาวในสัตว์กลุ่มครัสเตเชีย รวมทั้งกุ้งและปู (Van Hulten and Vlak, 2001; Flegel, 1997; Zhang *et al.*, 2001a)

ไวรัส WSSV จัดอยู่ในสกุล *Whispovirus* ในตระกูล *Baculoviridae* (Van Hulten *et al.*, 2000a,b,c; Van Hulten *et al.*, 2001a,b) เป็นไวรัสดีเอ็นเอสายคู่ (double-stranded DNA virus) รูปร่างเป็นแท่ง (rod-shaped) หรือ obovate (รูปที่ 10) ซึ่งมีส่วนปลายด้านหนึ่งยึดหยุ่นได้ มีขนาดโดยประมาณ 80-120 X 250-380 นาโนเมตร ทั้งนี้มักขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อ WSSV ที่แยกได้ในแต่ละพื้นที่ของการเกิดโรค (Durand *et al.*, 1997) เนื่องจากเชื้อ WSSV เป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งในสกุลพีนีส ซึ่งเป็นความเสียหายทางเศรษฐกิจที่สำคัญ ดังนั้นการศึกษาลักษณะเหนียวนำกุ้งด้วยเชื้อก่อโรค WSSV ต่อการแสดงออกของ FReP จึงมีความสำคัญในการเข้าใจการตอบสนองของกุ้งขาวต่อเชื้อก่อโรคในกุ้งต่อไป



รูปที่ 8 ลักษณะดวงขาวใต้เปลือกของกุ้งที่เป็นโรคตัวแดงดวงขาว (Lightner, 1996)



รูปที่ 9 ลักษณะผิวไตเป่ลือกและอวัยวะสร้างเม็ดเลือดของกึ่งที่เป็นโรคตัวแดงดวงขาว  
(ลูกศรชี้บริเวณที่ติดเชื้อไวรัส)  
(<http://www.kungthai.com/virus.html> วันที่สืบค้น 19 มีนาคม 2557)



รูปที่ 10 รูปร่างลักษณะของไวรัสโรคตัวแดงดวงขาว (Vlak, 2001)

### วัตถุประสงค์

1. เพื่อโคลนยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนจากกุ้งขาว (LvFReP)
2. เพื่อศึกษาสมบัติของยีนและการแสดงออกของยีน LvFReP ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งขาว
3. เพื่อศึกษาผลของการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อก่อโรคกุ้งต่อการแสดงออกของยีน LvFReP ในกุ้งขาว

## บทที่ 2

### วิธีการวิจัย

#### วัสดุ

##### 1. กุ้งตัวอย่าง

กุ้งที่ใช้ในการศึกษา คือ กุ้งขาวที่มีน้ำหนักประมาณ 10-15 กรัม ไม่อยู่ในระยะลอกคราบ ได้รับความอนุเคราะห์จากฟาร์มเกษตรกร อำเภอสิงหนคร จังหวัดสงขลา นำมาเลี้ยงในถังพลาสติกขนาด 130 ลิตร โดยให้อาหารเม็ดทุก 4-6 ชั่วโมง ที่ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

##### 2. แบคทีเรีย

- *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  มีลักษณะ Genotype: F<sup>-</sup>,  $\Phi$  80dlacZ  $\Delta$ M15, *endA1*, *recA1*, *hsdR17* (*r<sub>k</sub>*<sup>-</sup>, *m<sub>k</sub>*<sup>+</sup>), *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*,  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169,  $\lambda$ <sup>-</sup>

- White spot syndrome virus ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

##### 3. อนุชีวโมเลกุล

###### 3.1 DNA พาหะ (Plasmid vector)

pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega)

###### 3.2 DNA แม่แบบ (Template DNA) ที่ใช้ในการศึกษา

DNA แม่แบบที่ใช้ในวิทยานิพนธ์นี้คือ cDNA สายแรก (first-strand cDNA) ซึ่งเตรียมจากเนื้อเยื่อของกุ้งขาว

#### 4. สารเคมี

##### 4.1 สารเคมีเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade)

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Agar	BD-Bioscience
Bromophenol blue	Promega Corporation
Diethylpyrocarbonate	Sigma Chemical Co.
Ethylenediaminetetraacetic acid	Fisher Chemicals
Polyethylene glycol	Sigma Chemical Co.
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	Fisher Chemicals

##### 4.2 สารเคมีเกรดอณูชีววิทยา (Molecular biology grade)

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
100 Base pair DNA ladder	Biolabs
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside	Amresco
Agarose	Invitrogen
Ampicillin	Sigma Chemical Co.
Deoxynucleotide triphosphate	Promega
<i>EcoR</i> I	Biolabs
Ethidium bromide	Promega
Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit	Geneaid
GenRacer <sup>TM</sup> Kit	Invitrogen
High-Speed Plasmid Mini Kit	Geneaid
Luria Bertani broth	USB corporation
Plate count agar	BD-Bioscience
Superscript <sup>®</sup> III reverse transcriptase	Invitrogen
T4 DNA ligase	Promega
<i>Tag</i> DNA polymerase	Promega
Tripure Isolation Reagent	Roche
Tryptic soy broth	Bacto

## อุปกรณ์

อุปกรณ์	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
Autoclave	-	Hirayama
Bacteria incubator	1510E	Shel Lab
Balance (4 digits)	AB204-S	Mettler
Balance (3 digits)	GT410	Ohaus
Balance (2 digits)	PG5002-S	Mettler
Centrifuge	Avanti J-30I	Beckman Coulter
Centrifuge	5415C; 5804R	Eppendorf
Gel document	BioDoc-It™ System	UVP
Heating box	AccuBlock	Labnet
Hot plate	C-MAG HS7	IKA
Incubator	1510E	Shel Lab
Micocentrifuge	SD220	Clover
Micropipette	-	Eppendorf
Oven	-	Binder
Orbital shaker	-	GallenKamp
pH meter	713	Metrohm
Power supply	AE-8150; AE-8450	Atto
PCR	MJ Mini	Bio-Rad
Shaking Incubator	SI-23MC	BIOER
Slab gel electrophoresis	AE-6400	Atto
Submarine electrophoresis	Mupid-ex	Advance
UV-VIS spectrophotometer	160A	Shimadzu
Vortex	G-560E	Scientific Industries
Water bath	EcoTempTW20	Julabo

## วิธีดำเนินการ

### 1. การเตรียมตัวอย่างของกึ่งขาว

#### 1.1 การเตรียมฮีโมไซท์จากกึ่งขาว

ดูดฮีโมลิมพ์จากแอ่งเลือดบริเวณขาเดินคู่ที่ 3 ของกึ่งขาว ด้วยกระบอกฉีดยา ขนาด 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารกันเลือดแข็งตัว [450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) และ 10 mM HEPES, pH 7.5] (Gollas-Galvin *et al.*, 1999) ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) ที่ความเร็ว 800 x g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ดูดแยกส่วนใสและเซลล์ฮีโมไซท์ออกจากกัน เก็บตะกอนฮีโมไซท์ที่ -80 °C เพื่อใช้ในการสกัด total RNA สำหรับใช้ในการศึกษาต่อไป

#### 1.2 การเตรียมเนื้อเยื่อจากกึ่งขาว

นำกึ่งที่ดูดฮีโมลิมพ์ออกหมดแล้วมาทำการผ่าแยกเนื้อเยื่อต่าง ๆ ออกจากตัวกึ่ง ซึ่งประกอบด้วย ตับ หัวใจ ลำไส้ กระเพาะอาหาร ลิมฟอยด์ และกล้ามเนื้อ นำเนื้อเยื่อที่ตัดได้ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และแช่ในไนโตรเจนเหลวทันที เก็บเนื้อเยื่อต่าง ๆ ไว้ที่ -80 °C เพื่อใช้ในการสกัด total RNA สำหรับใช้ในการศึกษาต่อไป

### 2. การสกัด Total RNA โดยใช้ TriPure isolation reagent

เติม TriPure ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่มีเนื้อเยื่ออยู่ (จากข้อ 1) นำมาบดให้ละเอียดและเซนตริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 12,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเศษเซลล์ออก เติม TriPure ปริมาตร 800 ไมโครลิตร เพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำไปเซนตริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 12,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสใส่ในหลอดใหม่ เติม chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (vortex) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที นำไปเซนตริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 12,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสด้านบน (aqueous phase) ใส่ในหลอดใหม่ ตกตะกอน RNA ด้วย isopropanol ปริมาตร 450 ไมโครลิตร จากนั้นจึงผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมาประมาณ 4-6 ครั้ง บ่มไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้ RNA ตกตะกอน แล้วจึงนำไปเซนตริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 12,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนโดยการเติม 75% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการเขย่าด้วย vortex ให้ตะกอนลอย นำไปเซนตริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 7,600 x g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง และคว่ำบนกระดาษทิชชูเพื่อซับสารละลายออกให้หมด ตกตะกอน RNA ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที แล้วละลายตะกอนในน้ำที่ปราศจาก RNase (diethyl pyrocarbonate (DEPC)-treated water) ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 55 °C นาน 10 นาที วิเคราะห์ปริมาณ total RNA โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความ



ยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ( $A_{260}$ ) หาความบริสุทธิ์ของ RNA จากอัตราส่วนค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ( $A_{260}/A_{280}$ ) ค่าที่ได้ควรอยู่ในช่วง 1.7-2.1 เก็บ total RNA ที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ  $-80^{\circ}\text{C}$

### 3. การกำจัด DNA ที่ปนอยู่กับ RNA ด้วย DNase I

กำจัด DNA ที่ปนอยู่กับ RNA โดยการย่อยด้วย DNase I ก่อนการนำไปสังเคราะห์ cDNA สายแรก โดยการเติม RNA 1 ไมโครกรัม ผสมกับ 10X DNase I reaction buffer (40 mM Tris-HCl, pH 8.4 - 4 mM  $\text{MgCl}_2$  - 100 mM KCl), DNase I (1 U/ $\mu\text{l}$ ) ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร, RNaseOut (40 U/ $\mu\text{l}$ ) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และ DEPC-treated water จนปริมาตรครบ 10 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม 25 mM EDTA ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิ  $65^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปใช้สังเคราะห์ cDNA สายแรกต่อไป

### 4. การสังเคราะห์ cDNA สายแรก (first-strand cDNA)

สังเคราะห์ cDNA สายแรก ด้วยวิธี reverse transcription (RT) โดยนำ RNA ที่กำจัด DNA แล้วปริมาณ 1 ไมโครกรัม มาเติมสารละลาย 50  $\mu\text{M}$  Oligo(dT)<sub>20</sub> 1 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP Mix 1 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วย DEPC-treated water ให้ได้ 13 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ  $65^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำมาแช่น้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที เตรียมสังเคราะห์ cDNA สายแรกโดยเติมสารละลาย 5X First-Strand buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3 - 375 mM KCl - 15 mM  $\text{MgCl}_2$ ) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร, 0.1 M DTT 1 ไมโครลิตร, RNaseOut™ (40 U/ $\mu\text{l}$ ) 1 ไมโครลิตร และ Super Script™ III RT (reverse transcriptase) (200 U/ $\mu\text{l}$ ) 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการปิเปตขึ้นลง นำไปเซนตริฟิวจ์และบ่มที่อุณหภูมิ  $50^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 60 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่อุณหภูมิ  $70^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที นำมาแช่น้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที และเติม RNase H 0.5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำ cDNA สายแรก ที่เตรียมได้ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  เพื่อใช้เป็น DNA แม่แบบต่อไป

### 5. การโคลนยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนจากกุ้งขาว (LvFREp)

#### 5.1 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการโคลน DNA ชิ้นกลาง (Internal fragment)

##### ของยีน LvFREp

ออกแบบและสังเคราะห์ไพรเมอร์สำหรับโคลนชิ้นยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจน จากสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ที่มีการศึกษายีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนมาแล้วจากธนาคารยีน (GenBank) ผ่านฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology

Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) แล้วนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบโดยใช้โปรแกรม vector NTI เพื่อหาบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) สำหรับใช้ในการออกแบบและสังเคราะห์เป็น forward และ reverse primer เพื่อใช้ในการโคลนชิ้น DNA ของยีน LvFReP ของกิ้งขาว (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการโคลน DNA ชิ้นกลางของยีน LvFReP

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส
LvFReP-F1	5'-GCCAGAGCCTGAACCAGATCC-3'
LvFReP-R1	5'-TGACCGTGCCAATCATAACCAG-3'
$\beta$ -actin-F	5'-CAGATCCATGTTTCGAGACCTTC-3'
$\beta$ -actin-R	5'-GATGTCCACGTCGCACTTCAT-3'

## 5.2 การเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน LvFReP

ทำการเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน LvFReP ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ cDNA สายแรกเตรียมจากเนื้อเยื่อตับของกิ้งขาว (จากข้อ 4) เป็น DNA แม่แบบ และใช้ไพรเมอร์ LvFReP-F1 และ LvFReP-R1 (ตารางที่ 3) ผสมกับสารละลายในการทำ PCR (ตารางที่ 4) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำ PCR ภายใต้ภาวะดังแสดงในตารางที่ 5 และวิเคราะห์ผลการทำ PCR (PCR product) ที่ได้ด้วย 1% agarose gel electrophoresis

ตารางที่ 4 สารละลายที่ใช้ในการทำ PCR ของ cDNA ชิ้นกลาง

สารเคมี	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
5X PCR buffer	5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5
10 mM dNTPs	0.5
10 $\mu$ M Forward primer	0.5
10 $\mu$ M Reverse primer	0.5
Template DNA	0.5
Tag DNA polymerase	0.1
Sterile water	16.4
ปริมาตรรวม	25

## ตารางที่ 5 อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในการทำ PCR ของ cDNA ชั้นกลาง

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94	2 นาที	1
Denaturation	94	30 วินาที	} 35
Annealing	52	45 วินาที	
Extension	72	1 นาที	
Final elongation	72	5 นาที	1

### 5.3 การทำ Agarose gel electrophoresis

การเตรียม 1% agarose gel ทำโดยการละลายผงอะกาโรส (agarose) 0.4 กรัม ในบัฟเฟอร์ 1X TAE (40 mM Tris-acetate, pH 8.0 - 1 mM EDTA) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ต้มจนเดือดเพื่อให้อะกาโรสละลาย เมื่อเริ่มอุ่นเติม 10 mg/ml ethidium bromide ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร เทอะกาโรสเหลวลงในถาดเจลที่มีหัวเสียบเพื่อให้เจลแข็งตัวนาน 20 นาที ดึงหัวที่เสียบออกอย่างระมัดระวัง นำถาดเจลไปวางใน electrophoresis chamber ที่มีบัฟเฟอร์ 1X TAE จนท่วมเจล ผสมสารละลาย DNA 5 ส่วนกับ 6X loading dye 1 ส่วน (0.25% bromophenol blue - 0.25% xylene cyanol และ 30% glycerol) หยอดสารละลาย DNA ลงในช่องเจล ใช้กระแสไฟฟ้า 100-135 โวลต์ เมื่อเห็นแถบสีเคลื่อนที่ไปเกือบสุดปลายเจล หยุดกระแสไฟฟ้า นำเจลไปส่องดูแถบ DNA ด้วย ultraviolet (UV) box ถ่ายรูปเจลด้วยเครื่อง Gel Document

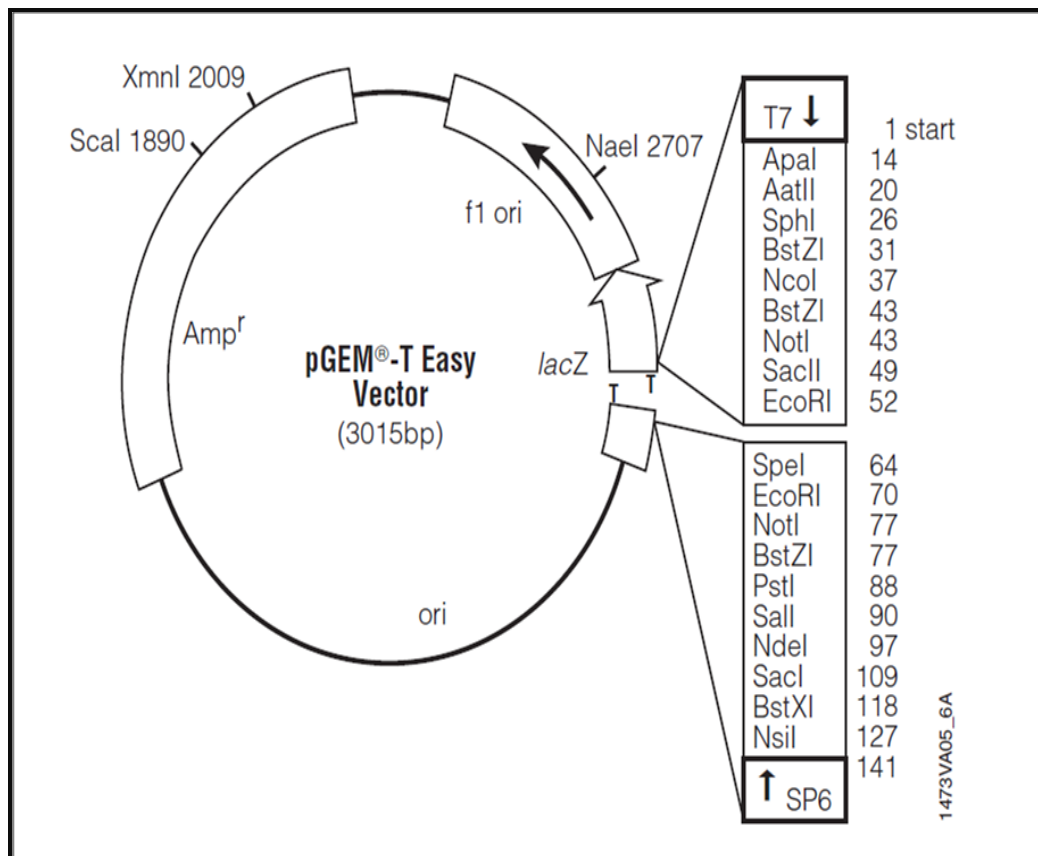
### 5.4 การสกัดชิ้น DNA ของยีน LvFRP ออกจากเจลโดยใช้ Gel/PCR DNA

#### Fragments Extraction Kit (Geneaid)

เมื่อเห็นแถบ DNA ตรงตามขนาดที่ต้องการ ตัดเจลด้วยใบมีด นำไปใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ DF ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 10-15 นาที จนชิ้นเจลละลายหมด ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เย็น ดูดสารละลายใส่คอลัมน์ DF นำไปเซนตริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 16,000 x g เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ W1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดอะกาโรสที่เหลือในคอลัมน์ นำไปเซนตริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 16,000 x g เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายทิ้ง ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ล้าง (Washing buffer) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที นำไปเซนตริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 16,000 x g เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายทิ้ง นำไปเซนตริฟิวจ์ ที่ความเร็วเดิม เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้คอลัมน์แห้ง จากนั้นนำคอลัมน์ DF วางบนหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ เติมบัฟเฟอร์ชะ (Elution buffer) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที นำไปเซนตริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 16,000 x g เป็นเวลา 2 นาที เพื่อชะ DNA ออกจากคอลัมน์ เก็บ DNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

### 5.5 การเชื่อมชิ้น DNA ของยีน LvFReP เข้ากับ DNA พาหะ

นำชิ้น DNA ของยีน LvFReP ที่สกัดแยกจากเจลไปเชื่อมกับ DNA พาหะคือ pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega) ดังรูปที่ 11 โดยนำ DNA ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร ผสมกับสารดังต่อไปนี้ pGEM<sup>®</sup>-T Easy (50 ng/μl) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, 2X Rapid ligation buffer (60 mM Tris-HCl, pH 7.8 - 20 mM MgCl<sub>2</sub> - 20 mM DTT - 2 mM ATP - 10% polyethylene glycol) ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร และเอนไซม์ T4 DNA ligase (3 U/μl) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 16<sup>o</sup> ซ เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง นำ DNA ลูกผสม (recombinant DNA) ที่ได้จากการเชื่อม DNA ของยีน LvFReP กับ DNA พาหะ เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* เพื่อเพิ่มจำนวนต่อไป



รูปที่ 11 แผนที่ลักษณะ DNA พาหะ pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega)

### 5.6 การเตรียม Competent cells จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$

นำเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ที่อยู่ในกลีเซอรอล (glycerol) เลี้ยงบนอาหาร Luria Bertani (LB) agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ ซ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว หลังจากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB (LB broth) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยบ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ ซ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือจางในอัตราส่วน 1:100 ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ ซ จนได้สารแขวนลอยเซลล์ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ( $A_{600}$ ) ประมาณ 0.5-0.6 ถ่ายใส่หลอด conical tube ขนาด 50 มิลลิลิตร วางบนน้ำแข็ง 10 นาที นำไปเซนตริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 3,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ ซ เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง แขนวลอยตะกอนเซลล์ด้วย TSS buffer (10% polyethylene glycol - 5% DMSO (dimethyl sulfoxide) - 20 mM MgCl $_2$ ) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมโดยการ pipette ชั่นลง นำเซลล์ที่เตรียมได้แบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 100 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -80 $^{\circ}$ ซ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

### 5.7 การนำ DNA ลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียโดยกระบวนการ Transformation

นำ competent cells ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  100 ไมโครลิตร (จากข้อ 5.6) วางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที ผสมกับ DNA ลูกผสมที่เตรียมได้ (จากข้อ 5.5) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร วางบนน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 $^{\circ}$ ซ เป็นเวลา 90 วินาที วางหลอดบนน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 2 นาที เติมน้ำอาหารเหลว LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ ซ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่เลี้ยงได้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB (LB agar) ที่มี 100  $\mu$ g/ $\mu$ l ampicillin, 80 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside (X-Gal) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ ซ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นเลือกโคโลนีสีขาวที่มี DNA ลูกผสม มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มี ampicillin ความเข้มข้น 100  $\mu$ g/ $\mu$ l เลี้ยงในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ ซ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

### 5.8 การสกัดพลาสมิดโดยใช้ High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid)

นำโคโลนีสีขาวที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มี ampicillin (จากข้อ 5.7) ไปเซนตริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 16,000 x g เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนสารละลายทิ้ง แขนวลอยตะกอนเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ PD1 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ PD2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดไปมาเบา ๆ ประมาณ 4-6 ครั้ง ตั้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที เติมน้ำบัฟเฟอร์ PD3 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดไปมาเบา ๆ ประมาณ 4-6 ครั้ง นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 16,000 x g เป็นเวลา 3 นาที ดูดส่วนใสไว้ในคอลัมน์ PD นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 16,000

x g เป็นเวลา 30 วินาที เติสสารละลายทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ W1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำไป เซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 16,000 x g เป็นเวลา 30 วินาที เติสสารละลายทิ้ง ล้างคอลัมน์ด้วย บัฟเฟอร์ล้าง ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 16,000 x g เป็นเวลา 30 วินาที เติสสารละลายทิ้ง นำไปเซนตริฟิวจ์ซ้ำอีก 3 นาที เพื่อให้คอลัมน์แห้ง จากนั้นย้ายคอลัมน์ PD ไปวางในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ชะ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เพื่อ ชะพลาสมิตออกจากคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 16,000 x g เป็นเวลา 2 นาที เก็บพลาสมิตที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้ในการทดลอง ต่อไป

### 5.9 การตรวจสอบ DNA ลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR I*

นำพลาสมิตที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR I* เพื่อตรวจหา DNA ลูกผสม โดยนำพลาสมิตที่สกัดได้ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เติมสารดังต่อไปนี้ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR I* ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 10X reaction buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และน้ำ DI ปริมาตร 6 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ตรวจสอบผลด้วย 1% agarose gel electrophoresis

### 5.10 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

นำพลาสมิตลูกผสมที่มีชิ้น DNA ของยีน LvFRcP ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอ ไทด์ด้วยเครื่อง ABI Prism 3730XL DNA Sequencer (Applied Biosystems) ของบริษัท Biobasic Inc. โดยใช้ SP6 และ T7 เป็นไพรเมอร์ของพลาสมิต

### 5.11 การเพิ่มปริมาณชิ้น DNA ของปลาย 3' และ 5' ด้วยวิธี Rapid amplification cDNA end (RACE) โดยใช้ GeneRacer™ Kit (Invitrogen)

#### 5.11.1 การสร้าง cDNA สายแรก

##### 5.11.1.1 การกำจัดหมู่ฟอสเฟตออกจาก RNA (Dephosphorylation of RNA) โดยเอนไซม์ calf intestinal phosphatase (CIP)

นำ total RNA ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อตับของกิ้งขาว (จากข้อ 2) ปริมาตร 5 ไมโครกรัม เติมส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 10X CIP buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 8.5 - 1 mM EDTA), RNaseOut™ (40 U/μl), CIP (10 U/ μl ใน 25 mM Tris-HCl, pH 7.6 - 1 mM MgCl<sub>2</sub> - 0.1 mM ZnCl<sub>2</sub> - 50% (w/v) glycerol) ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร และเติม DEPC-treated water จนมีปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อเสร็จขั้นตอนนี้นำ RNA ไปวางบนน้ำแข็งเพื่อใช้ในการ ทดลองต่อไป

### 5.11.1.2 การตกตะกอน RNA (RNA precipitation)

นำสารละลาย (จากข้อ 5.11.1.1) ผสมกับ DEPC-treated water ปริมาตร 90 ไมโครลิตร และ phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม นาน 30 วินาที จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 16,000 x g ที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ตูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 10 mg/ml mussel glycogen ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, 3 M sodium acetate, pH 5.2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และ absolute ethanol ปริมาตร 220 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วแช่ แข็งในน้ำแข็งแห้งนาน 10 นาที นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 16,000 x g อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งส่วนใส แล้วล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้า กันโดยการพลิกหลอดไปมา นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 16,000 x g อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง ตากตะกอน RNA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นละลายตะกอน RNA ด้วย DEPC-treated water ปริมาตร 7 ไมโครลิตร

### 5.11.1.3 การนำ 5' Cap ออกจากปลาย 5' ของ mRNA

#### (Removing of mRNA cap structure)

เตรียมสารละลายที่ประกอบด้วย 10X TAP buffer (0.5 M sodium acetate, pH 6.0 - 10 mM EDTA - 1% β-mercaptoethanol - 0.1% Triton X-100), RNaseOut™ (40 U/μl ใน 20 mM Tris-HCl, pH 8 - 50 mM KCl - 0.5 mM EDTA - 8 mM DTT - 50% (v/v) glycerol), Tobacco acid pyrophosphatase (TAP) (0.5 U/μl ใน 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 - 0.1 M NaCl - 0.1 mM EDTA - 1 mM DTT - 0.01% Triton X-100 - 50% (w/v) glycerol) ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร และ dephosphorylated RNA (จากข้อ 5.11.1.2) ปริมาตร 7 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เอนไซม์ทำงานได้ดี นำไปแช่น้ำแข็ง จากนั้นตกตะกอน mRNA ตามวิธีข้อ 5.11.1.2 แล้ว จึงละลายตะกอนกลับด้วย DEPC-treated water ปริมาตร 7 ไมโครลิตร

### 5.11.1.4 การเชื่อมต่อ GeneRacer™ RNA Oligo เข้ากับ ปลาย 5'

#### ของ mRNA (Ligation of RNA oligo decapped mRNA)

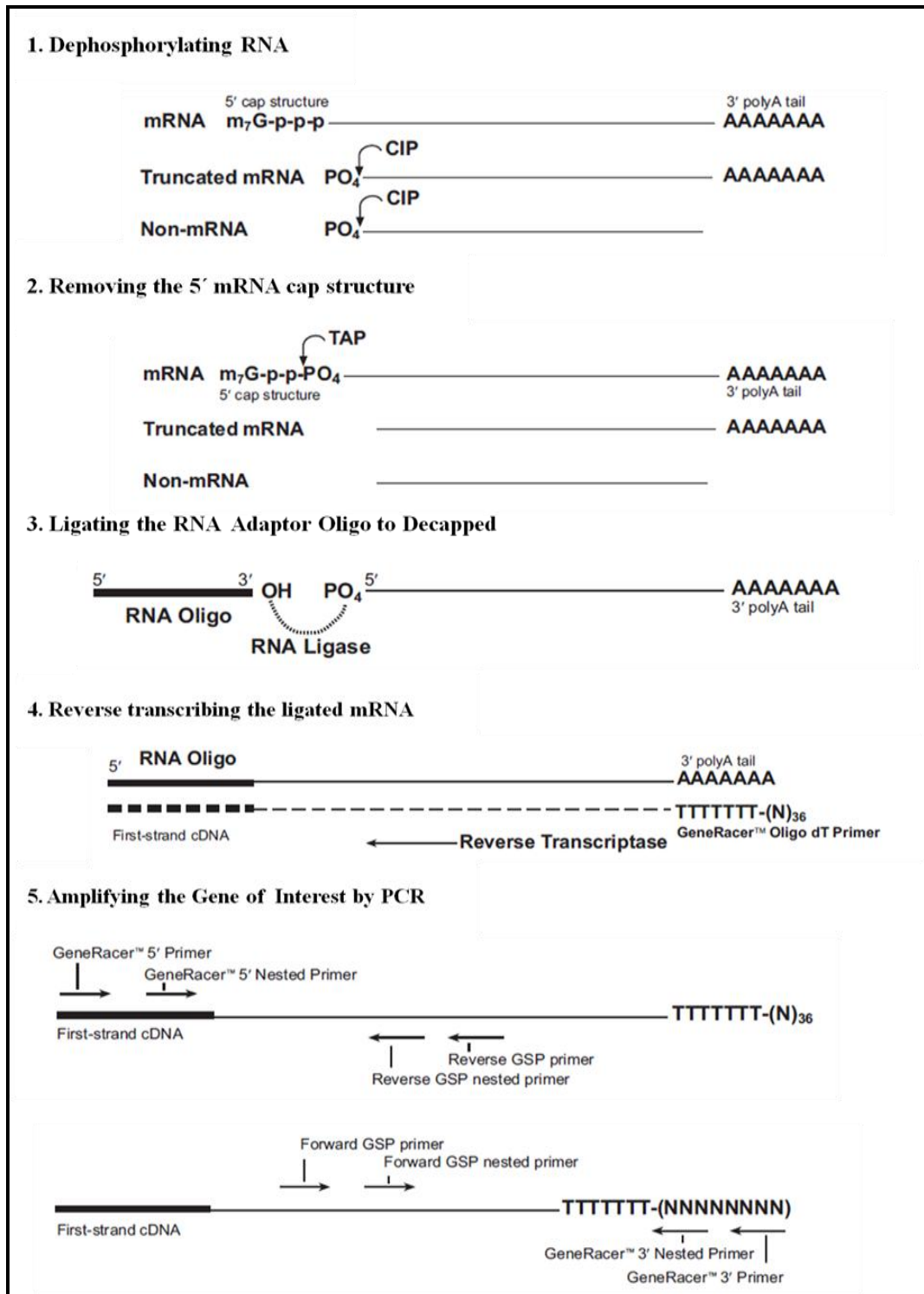
นำสารละลาย (จากข้อ 5.11.1.3) ปริมาตร 7 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดที่มี 0.25 ไมโครกรัม lyophilized GeneRacer™ RNA Oligo ผสมสารละลายให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำลายโครงสร้างทุติยภูมิของ RNA จากนั้นแช่น้ำแข็ง 2 นาที เติม 10X T4 Ligase buffer (330 mM Tris-acetate, pH 7.8 - 660 mM potassium acetate - 100 mM magnesium acetate - 5 mM DTT), 10 mM ATP, RNaseOut™ (40 U/μl) และ T4 RNA ligase (5 U/μl ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 - 0.1 M NaCl - 0.1 mM EDTA - 1 mM DTT - 0.1% Triton® X-100 - 50% (w/v) glycerol) ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เซนตริฟิวจ์เบา ๆ นำไปแช่น้ำแข็ง

จากนั้นตกตะกอน mRNA ตามวิธีข้อ 5.11.1.2 แล้วจึงละลายตะกอนด้วย DEPC-treated water ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

#### 5.11.1.5 การสังเคราะห์ cDNA สายแรก จาก mRNA (Reverse transcription of mRNA)

นำ RNA ที่เตรียมได้จากข้อ 5.11.1.4 ผสมกับไพรเมอร์ GeneRacer RNA Oligo dT (5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTG(T)<sub>24</sub>-3' 60 bases), dNTP Mix และ DEPC-treated water ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำลายโครงสร้างทุติยภูมิของ RNA จากนั้นแช่น้ำแข็ง 2 นาที แล้วจึงนำมาผสมกับ 5X RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3 - 375 mM KCl - 15 mM MgCl<sub>2</sub>) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร, 0.1 M DTT ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, Superscrip™ III RT (200 U/μl ใน 20 mM Tris-HCl, pH 7.5 - 100 mM NaCl - 0.1 mM EDTA - 1 mM DTT - 0.01% (v/v) Nonidet P-40 - 50% (w/v) glycerol) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ RNaseOut™ (40 U/μl) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นย้ายไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อยับยั้งการทำงานของ Superscrip™ III RT แล้วจึงนำไปแช่น้ำแข็งทันที 2 นาที แล้วจึงเติม RNase H (2 U/μl ใน 20 mM Tris-HCl, pH 7.5 - 100 mM KCl - 10 mM MgCl<sub>2</sub> - 0.1 mM EDTA - 0.1 mM DTT - 50 μg/ml BSA - 50% glycerol) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 20 นาที เพื่อทำลาย RNA นำ cDNA สายแรกที่สังเคราะห์ได้ เป็นแม่แบบในการเพิ่มปริมาณ DNA ทางด้านปลาย 5' และ 3' ด้วยเทคนิค Rapid amplification of cDNA ends (RACE)





รูปที่ 12 แผนภาพแสดงขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA สายแรก สำหรับการเพิ่มปริมาณ DNA ด้านปลาย 5' และ 3'

CIP, calf intestinal phosphatase; TAP, tobacco acid pyrophosphatase

### 5.11.2 การเพิ่มปริมาณ DNA ด้านปลาย 3'

การเพิ่มปริมาณ DNA ด้านปลาย 3' ของยีน LvFReP อาศัยเทคนิค RACE โดยใช้ cDNA สายแรก (จากข้อ 5.11.1.5) เป็น DNA แม่แบบ ใช้ไพรเมอร์ GeneRacer™ 3' และ 3' RACE-F (LvFReP, GSP) (ตารางที่ 6) ในการเพิ่มปริมาณ DNA ด้านปลาย 3' (รอบที่ 1) ผสมสารละลายดังแสดงในตารางที่ 7 ทำ PCR ภายใต้ภาวะดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณ DNA ด้านปลาย 3'

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส
GeneRacer™ 3'	5'-CGCTACGTAACGGCATGACAGTG-3'
GeneRacer™ 3' Nested Primer	5'-CGCTACGTAACGGCATGACAGTG-3'
3' RACE-F (LvFReP, GSP)	5'-CGAATCTCAACGGCGTGTACTACAGGG-3'

ตารางที่ 7 สารละลายที่ใช้ในการทำ PCR ด้านปลาย 3' (รอบที่ 1)

สารเคมี	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
5X PCR buffer	5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5
10 mM dNTPs	0.5
GeneRacer™ 3'	1.5
3' RACE-F (LvFReP, GSP)	0.5
Template DNA	0.5
Tag DNA polymerase	0.1
Sterile water	15.4
ปริมาตรรวม	25

ตารางที่ 8 อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในการทำ PCR ด้านปลาย 3' (รอบที่ 1)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ (รอบ)
Initial denaturation	94	2 นาที	1
Denaturation	94	30 วินาที	} 35
Annealing	68	45 วินาที	
Extension	72	1 นาที	
Final elongation	72	5 นาที	1

สำหรับการเพิ่มปริมาณ DNA ด้านปลาย 3' (รอบที่ 2) และด้านปลาย 3' Nested ใช้ผลผลิตจากการทำ PCR ด้านปลาย 3' (รอบที่ 1) เป็น DNA แม่แบบ เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ด้านปลาย 3' (รอบที่ 2) ใช้ไพรเมอร์ GeneRacer™ 3' และ 3' RACE-F (LvFReP, GSP) ส่วนด้านปลาย 3' Nested ใช้ไพรเมอร์ GeneRacer™ 3' Nested และ 3' RACE-F (LvFReP, GSP) ผสมกับสารละลายที่ใช้ในการทำ PCR ดังแสดงในตารางที่ 9 ทำ PCR ภายใต้ภาวะดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 9 สารละลายที่ใช้ในการทำ PCR ด้านปลาย 3' (รอบที่ 2) และด้านปลาย 3'

## Nested

สารเคมี	3' RACE (ไมโครลิตร)	3' Nested (ไมโครลิตร)
5X PCR buffer	5	5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5	1.5
10 mM dNTPs	0.5	0.5
GeneRacer™ 3' (10 μM)	0.5	-
GeneRacer™ 3' Nested (10 μM)	-	0.5
3' RACE-F (LvFReP, GSP) (10 μM)	0.5	0.5
Template (PCR product ของ 3' RACE (รอบที่ 1))	0.5	0.5
Tag DNA polymerase	0.1	0.1
Sterile water	16.4	16.4
ปริมาตรรวม	25	25

ตารางที่ 10 อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในการทำ PCR ด้านปลาย 3' (รอบที่ 2) และด้านปลาย 3' Nested

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ (รอบ)
Initial denaturation	94	2 นาที	1
Denaturation	94	0.50 นาที	5
Annealing	72	0.50 นาที	
Extension	72	1.00 นาที	
Denaturation	94	0.50 นาที	5
Annealing	70	0.50 นาที	
Extension	72	1.00 นาที	
Denaturation	94	0.50 นาที	25
Annealing	68	0.50 นาที	
Extension	72	1.00 นาที	
Final extension	72	5.00 นาที	1

เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการทำ PCR จะนำ PCR product ด้านปลาย 3' ที่ได้มาวิเคราะห์ผล ด้วย 1% agarose gel electrophoresis จากนั้นสกัดชิ้น DNA ด้านปลาย 3' และ 3' Nested ของยีน LvFReP ออกจากเจลโดยใช้ Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (Geneaid) ตามวิธีข้อ 5.4 นำไปเชื่อมเข้ากับ DNA พาหะ pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega) ตามวิธีข้อ 5.5 แล้วจึงนำ DNA ลูกลมเข้าสู่ competent cells ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ตามวิธีข้อ 5.7 ทำการสกัดพลาสมิดโดยใช้ High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid) ตามวิธีข้อ 5.8 และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 3' และ 3' Nested ของยีน LvFReP ตามวิธีข้อ 5.10 จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นกลางและด้านปลาย 3' ของยีน LvFReP มาเชื่อมต่อกัน (overlapping) ด้วยโปรแกรม vector NTI เพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ที่มีขนาดยาวขึ้น จากนั้นเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนที่โคลนได้ของกิ้งชากับลำดับเบสของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนจากกิ้งหรือครัสเตเชียนชนิดต่าง ๆ

### 5.11.3 การเพิ่มปริมาณ DNA ด้านปลาย 5'

ทำการเพิ่มปริมาณ DNA ด้านปลาย 5' ของยีน LvFReP ด้วยเทคนิค RACE โดยใช้ cDNA สายแรก (จากข้อ 5.11.1.5) เป็น DNA แม่แบบ ใช้ไพรเมอร์ GeneRacer<sup>™</sup> 5' และ 5' RACE-R (LvFReP, GSP) (ตารางที่ 11) ในการเพิ่มปริมาณ DNA ด้านปลาย 5' (รอบที่ 1) ผลสมการละลายดังแสดงในตารางที่ 12 ทำ PCR ภายใต้ภาวะดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณ DNA ด้านปลาย 5'

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส
GeneRacer™ 5'	5'- CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3'
GeneRacer™ 5' Nested	5'- GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA-3'
5' RACE-R1 (LvFReP, GSP)	5'- CGAAGCGGATCTGGTTCAGGCTCTGG-3'
5' RACE-R2 (LvFReP, GSP)	5'- TGTGGCTAGTGAAGGAGTCTTGGGCGT-3'
5' RACE-R3 (LvFReP, GSP)	5'-CACTTCTTGTACCACCAGCCGCCCTTGT-3'
5' RACE-R4 (LvFReP, GSP)	5'-GCCGCTGTAATGGTTCACTTCGAGCTTG-3'
5' RACE-R5 (LvFReP, GSP)	5'-TGTGGTACACGCCGTTGAGATTGGTCGA-3'
5' RACE-R6 (LvFReP, GSP)	5'-TGCATATGACTCGTGGTGTCCCCTGTGG-3'
5' RACE-R7 (LvFReP, GSP)	5'-CGCCGTTGAGATTGGTCGAATGGCACT-3'
5' RACE-R8 (LvFReP, GSP)	5'-CGTCCAGCCGCCGCGTTCGCTCGTCAT-3'
5' RACE-R9 (LvFReP, GSP)	5'-GCCACGTTGCCGAAGCCGAGGACGTACT-3'

ตารางที่ 12 สารละลายที่ใช้ในการทำ PCR ด้านปลาย 5' (รอบที่ 1)

สารเคมี	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
5X PCR buffer	5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5
10 mM dNTPs	0.5
GeneRacer™ 5'	1.5
5' RACE-R (LvFReP, GSP)	0.5
Template DNA	0.5
Tag DNA polymerase	0.1
Sterile water	15.4
ปริมาตรรวม	25

ตารางที่ 13 อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในการทำ PCR ด้านปลาย 5' (รอบที่ 1)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ (รอบ)
Initial denaturation	94	2 นาที	1
Denaturation	94	30 วินาที	} 35
Annealing	68	45 วินาที	
Extension	72	1 นาที	
Final elongation	72	5 นาที	1

สำหรับการเพิ่มปริมาณ DNA ด้านปลาย 5' (รอบที่ 2) และด้านปลาย 5' Nested ใช้ผลผลิตจากการทำ PCR ด้านปลาย 5' (รอบที่ 1) เป็น DNA แม่แบบ โดยการเพิ่มปริมาณ DNA ด้านปลาย 5' (รอบที่ 2) ใช้ไพรเมอร์ GeneRacer™ 5' และ 5' RACE-R (LvFReP, GSP) ส่วนด้านปลาย 5' Nested ใช้ไพรเมอร์ GeneRacer™ 5' Nested และ 5' RACE-R (LvFReP, GSP) ผสมกับสารละลายที่ใช้ในการทำ PCR ดังแสดงในตารางที่ 14 ทำ PCR ภายใต้ภาวะดังแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 14 สารละลายที่ใช้ในการทำ PCR ด้านปลาย 5' (รอบที่ 2) และด้านปลาย 5' Nested

สารเคมี	5' RACE (ไมโครลิตร)	5' Nested (ไมโครลิตร)
5X PCR buffer	5	5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5	1.5
10 mM dNTPs	0.5	0.5
GeneRacer™ 5' (10 μM)	0.5	-
GeneRacer™ 5' Nested (10 μM)	-	0.5
5' RACE-R (LvFReP, GSP) (10 μM)	0.5	0.5
Template (PCR product ของ 5' RACE (รอบที่ 1))	0.5	0.5
Tag DNA polymerase	0.1	0.1
Sterile water	16.4	16.4
ปริมาตรรวม	25	25

ตารางที่ 15 อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในการทำ PCR ด้านปลาย 5' (รอบที่ 2) และด้านปลาย 5' Nested

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ (รอบ)
Initial denaturation	94	2 นาที	1
Denaturation	94	0.50 นาที	5
Annealing	72	0.50 นาที	
Extension	72	1.00 นาที	
Denaturation	94	0.50 นาที	5
Annealing	70	0.50 นาที	
Extension	72	1.00 นาที	
Denaturation	94	0.50 นาที	25
Annealing	68	0.50 นาที	
Extension	72	1.00 นาที	
Final extension	72	5.00 นาที	1

เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการทำ PCR จะนำ PCR product ด้านปลาย 5' ที่ได้มาวิเคราะห์ผล ด้วย 1% agarose gel electrophoresis จากนั้นสกัดชิ้น DNA ด้านปลาย 5' และ 5' Nested ของยีน LvFREP ออกจากเจลโดยใช้ Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (Geneaid) ตามวิธีข้อ 5.4 นำไปเชื่อมเข้ากับ DNA พาหะ pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega) ตามวิธีข้อ 5.5 แล้วจึงนำ DNA ลุกผสมเข้าสู่ competent cells ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ตามวิธีข้อ 5.7 ทำการสกัดพลาสมิดโดยใช้ High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid) ตามวิธีข้อ 5.8 และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 5' และ 5' Nested ของยีน LvFREP

### 5.12 การโคลน DNA ส่วน Open reading frame (ORF) ของยีน LvFREP

#### จากกุ้งขาว

ทำการออกแบบ forward primer จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน FmFREP ของกุ้งแช่บ๊วย และ reverse primer จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน LvFREP ของกุ้งขาว จากนั้นนำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ มาทำการโคลน DNA ส่วน ORF ของยีน LvFREP โดยทำการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ cDNA สายแรกที่ได้จากเนื้อเยื่อตับของกุ้งขาวเป็นแม่แบบ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายที่ใช้ในการทำ PCR ดังนี้ 5X PCR buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl<sub>2</sub> ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร, 10 mM dNTPs ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, 10  $\mu$ M forward primer (ORF-LvFREP-F), 10  $\mu$ M reverse primer (ORF-

LvFR<sub>eP</sub>-R) ดังแสดงในตารางที่ 16 ปริมาตรอย่างละ 0.5 ไมโครลิตร, Tag DNA polymerase ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร และเติมน้ำ DI จนครบปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน จากนั้นทำ PCR ภายใต้สภาวะ Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ และทำ 35 รอบของสภาวะ Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เวลา 30 วินาที, Annealing ที่อุณหภูมิ 52 °C เวลา 45 วินาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เวลา 1.50 นาที และจำนวน 1 รอบสุดท้ายของ Final elongation ที่อุณหภูมิ 72 °C เวลา 5 นาที จากนั้นวิเคราะห์ผลผลิตจากการทำ PCR ด้วย 1% agarose gel electrophoresis แล้วจึงสกัดชิ้น DNA ของยีน LvFR<sub>eP</sub> จากเจลอะกาโรส ตามวิธีข้อ 5.4 นำชิ้น DNA บริสุทธิ์ไปเชื่อมต่อกับ DNA พาหะ pGEM<sup>®</sup>-T Easy ตามวิธีข้อ 5.5 แล้วจึงนำ DNA ลูกผสมเข้าสู่ competent cells ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ตามวิธีข้อ 5.7 ทำการสกัดพลาสมิด ตามวิธีข้อ 5.8 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I ตามวิธีข้อ 5.9 เพื่อตรวจหา DNA ลูกผสมแล้วนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ขึ้นกลาง และด้านปลาย 3' ที่เชื่อมต่อกันแล้ว มาเชื่อมต่อกับบริเวณ ORF ของยีน LvFR<sub>eP</sub> ด้วยโปรแกรม vector NTI เพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ยาวขึ้นของยีน LvFR<sub>eP</sub> ของกุ้งขาว

ตารางที่ 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA ส่วน ORF ของยีน LvFR<sub>eP</sub>

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส
ORF-LvFR <sub>eP</sub> -F	5'-ATGAGCCCAACGGCAATAGT-3'
ORF-LvFR <sub>eP</sub> -R	5'-TTAGAATCTTGGTTTGATCTTCA-3'

### 5.13 การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน LvFR<sub>eP</sub> ของกุ้งขาวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของกุ้งหรือสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนชนิดต่าง ๆ เพื่อวิเคราะห์ความเหมือน (% identity) โดยใช้ BLAST program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) วิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม The Expert Protein Analysis System (<http://www.expasy.org>) หาตำแหน่ง FReD ด้วย SMART service (<http://smart.emblheidelberg.de>) หา Signal peptide โดยใช้ SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/service/signalP>) นำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่มี FReD มาเปรียบเทียบ (alignment) โดยใช้ ClustalW Multiple Alignment program (<http://www.ebi.ac.uk/clustalW>) และศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA 5.2



## 6. การศึกษาการแสดงออกของยีน LvFReP ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ

นำ total RNA ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อต่าง ๆ ซึ่งได้แก่ เซลล์ฮีโมไซท์ ตับ ลำไส้ เหงือก กระเพาะอาหาร กล้ามเนื้อ หัวใจ และลิมโฟcyt (จากข้อ 2) นำมาทำลาย DNA ที่ปนเปื้อนด้วย DNase I จากนั้นสังเคราะห์ cDNA สายแรก ตามวิธีข้อ 4 เพื่อใช้เป็น DNA แม่แบบในการเพิ่มปริมาณ โดยผสมกับสารละลายในการทำ PCR (ตารางที่ 4) ใช้ไพรเมอร์ที่ใช้ในการโคลน DNA ชั้นกลางของยีน LvFReP และ  $\beta$ -actin (ตารางที่ 3) ทำ PCR ภายใต้สภาวะ Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ และทำ 35 รอบของสภาวะ Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เวลา 30 วินาที, Annealing ที่อุณหภูมิ 52 °C เวลา 45 วินาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เวลา 1 นาที และ 1 รอบสุดท้ายของ Final elongation ที่อุณหภูมิ 72 °C เวลา 5 นาที จากนั้นดูการแสดงออกของ mRNA ของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจน โดยนำผลผลิตของ LvFReP และ  $\beta$ -actin ที่ได้จากการทำ PCR ตรวจสอบการแสดงออกด้วยการทำ อิเล็กโทรโฟรีซิส บนเจลอะกาโรส 1% วัดความเข้มของแถบ (band intensity) โดยใช้ Gel Document รุ่น BioDoc-It™ system ด้วยโปรแกรม Labworks 4.0 คำนวณค่าอัตราส่วนความเข้มแถบของยีน LvFReP เทียบกับยีน  $\beta$ -actin (relative intensity)

## 7. การศึกษาผลการเหนี่ยวนำกุงด้วยจุลินทรีย์ก่อโรคต่อระดับการแสดงออกของยีน

### LvFReP

#### 7.1 การเตรียมจุลินทรีย์

สำหรับ WSSV เตรียม stock WSSV โดยตัดกล้ามเนื้อของกุงที่ติดเชื้อ WSSV บดให้ละเอียดใน TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.5 - 0.85% NaCl) ในอัตราส่วน 1:2 (น้ำหนักเนื้อเยื่อ:ปริมาตร TBS) (กิจการ สุภมาตย์ และคณะ, 2543) แล้วเซนตริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 41,800 x g นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เก็บส่วนใสที่กรองผ่านกระดาษกรอง (0.45 ไมครอน) ไว้ที่ -80 °C เพื่อใช้ทดลองต่อไป

#### 7.2 การเตรียมกุงตัวอย่างก่อนการเหนี่ยวนำด้วย WSSV

เลี้ยงกุงขาวในถังพลาสติกกลมความจุ 25 แกลลอน (gallon) โดยเตรียมถังก่อนเลี้ยงกุงดังนี้ ล้างถัง ผ่าเชื้อด้วยคลอรีนและทิ้งให้แห้งอย่างน้อย 2 วัน จากนั้นใส่น้ำทะเลที่มีคลอรีนฆ่าเชื้อปริมาณประมาณครึ่งถัง ลงในถัง ให้อากาศตลอดเวลา ทิ้งไว้ประมาณ 1 อาทิตย์ แล้วนำกุงที่คัดขนาดใกล้เคียงกัน ซึ่งมีน้ำหนักประมาณตัวละ 10-15 กรัม ลงเลี้ยงถังละ 4-5 ตัว โดยให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปทุก 4-6 ชั่วโมง ปล่อยให้กุงปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในถัง นาน 3 วัน โดยสังเกตว่ากุงแข็งแรงไม่มีอาการอ่อนเพลีย ว่ายน้ำและกินอาหารเป็นปกติ

### 7.3 การศึกษาผลการฉีดกุงด้วย WSSV ต่อการแสดงออกของยีน LvFReP โดย

#### วิธี semiquantitative RT-PCR

นำเชื้อ WSSV เจือจางด้วย 0.85% NaCl ให้ได้ความเข้มข้น  $10^{-6}$  เท่า ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ฉีดกุงที่บริเวณกล้ามเนื้อโคนหาง เพื่อกระตุ้นให้กุงติดโรค จากนั้นนำกุงไปเลี้ยงต่อตามปกติ ตัดดับกุงหลังการฉีดที่เวลา 0, 3, 6, 12, 18, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง กลุ่มละ 5 ตัว จากนั้นนำดับที่ได้ไปสกัด total RNA (ตามวิธีข้อ 2) และนำไปสังเคราะห์ cDNA สายแรก (ตามวิธีข้อ 4) เพื่อใช้เป็น DNA แม่แบบในการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ไพรเมอร์ที่ใช้ในการโคลน DNA ขึ้นกลางของยีน LvFReP และ  $\beta$ -actin (ตารางที่ 3) โดยผสมกับสารละลายในการทำ PCR (ตารางที่ 4) โดยนำผลผลิตของ LvFReP และ  $\beta$ -actin ที่ได้จากการทำ PCR ตรวจสอบการแสดงออกด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส บนเจลอะกาโรส 1% วัดความเข้มของแถบ โดยใช้ Gel Document รุ่น BioDoc-It™ system ด้วยโปรแกรม Labworks 4.0 คำนวณค่าอัตราส่วนความเข้มแถบของยีน LvFReP เทียบกับยีน  $\beta$ -actin

## บทที่ 3

### ผลการทดลอง

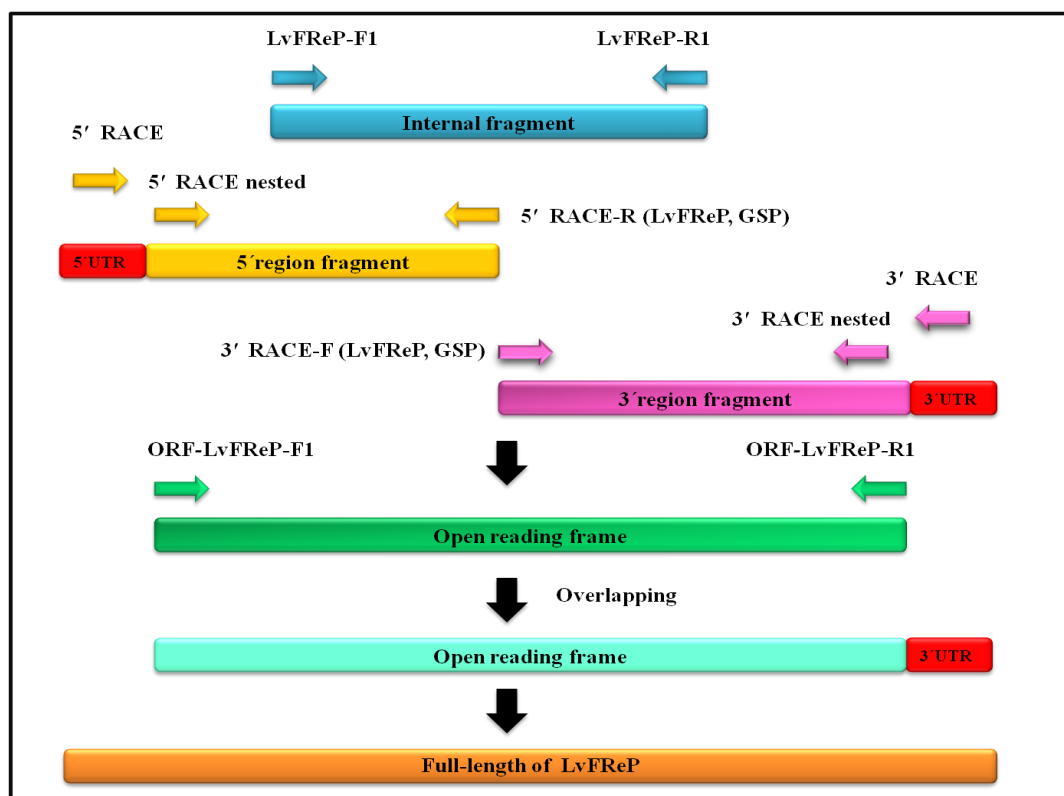
#### 1. การโคลนชิ้น DNA ของยีน LvFReP จากตับของกุงขาว

##### 1.1 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับโคลนยีน LvFReP

สำหรับการโคลน DNA ชิ้นกลางของยีน LvFReP เริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์ ซึ่งได้มาจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ FReP จากสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ที่มีรายงานอยู่ในธนาคารยีน (GenBank) ผ่านฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม Vector NTI พบบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ของ FReP อยู่หลายบริเวณ ทำการเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอนุรักษ์ดังกล่าวมาใช้ออกแบบเป็น forward และ reverse primer ซึ่งไพรเมอร์ที่ได้ คือ LvFReP-F1 และ LvFReP-R1 ดังแสดงในตารางที่ 3

##### 1.2 แบบแผนการโคลน DNA ของยีน LvFReP

แบบแผนการโคลน DNA ของยีน LvFReP เริ่มจากการใช้ cDNA สายแรกที่ได้สังเคราะห์ได้จากเนื้อเยื่อตับเป็นแม่แบบในการเพิ่มปริมาณ DNA ชิ้นกลางของ LvFReP หลังจากนั้นจึงทำการออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ชิ้นกลางที่ได้ เพื่อใช้เป็นไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณ DNA ทางด้านปลาย 3' (3' RACE-F (LvFReP, GSP)) ซึ่ง cDNA สายแรกสำหรับการใช้ในการทำ 3' RACE จะสังเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ oligo (dT) ที่มีการเชื่อมต่อกับลำดับนิวคลีโอไทด์อื่นอีก 36 คู่เบส แล้วจึงนำ cDNA สายแรกที่ได้ใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มปริมาณ DNA ทางด้านปลาย 3' ของยีน LvFReP จากกุงขาว ด้วยเทคนิค RACE ในทำนองเดียวกันทำการออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ชิ้นกลางที่ได้ เพื่อใช้เป็นไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณ DNA ทางด้านปลาย 5' (5' RACE-R (LvFReP, GSP)) และออกแบบไพรเมอร์ของส่วนที่เป็น ORF ของยีน เพื่อใช้เป็นไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วนที่เป็น ORF ของยีน นำลำดับนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 3' และ ORF มาเชื่อมต่อกันด้วยโปรแกรม Vector NTI ดังแสดงในรูปที่ 13

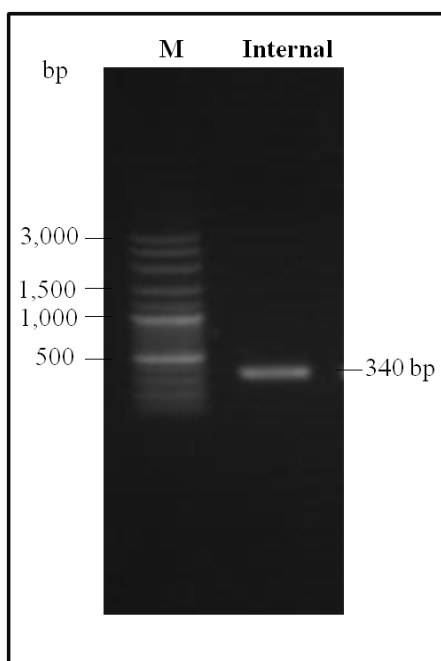


รูปที่ 13 แบบแผนการโคลน DNA ของยีน LvFReP ของกุ้งขาว

### 1.3 การเพิ่มปริมาณ DNA ชั้นกลางของยีน LvFReP

ในการโคลน DNA ชั้นกลางของยีน LvFReP ใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ตามผลข้อ 1.1 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ cDNA สายแรกที่เตรียมได้จากตับของกุ้งขาวเป็น DNA แม่แบบ นำ PCR product ที่ได้มาตรวจสอบผลด้วย 1% agarose gel electrophoresis พบแถบ DNA เพียงแถบเดียวมีขนาดประมาณ 340 คู่เบส ดังแสดงผลในรูปที่ 14 ทำการสกัด DNA ออกจากเจล นำไปเชื่อมต่อกับ DNA พาหะ pGEM<sup>®</sup>-T Easy และเพิ่มปริมาณ DNA ลูกผสมในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) จากนั้นคัดเลือกโคโลนีสีขาวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มี ampicillin นำเซลล์ที่เลี้ยงได้มาสกัดพลาสมิด ทำการตรวจสอบดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I เลือกพลาสมิดลูกผสมที่มีชั้นยีนแทรกอยู่ จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า DNA ชั้นกลางของยีน LvFReP มีความยาว 340 คู่เบส มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังแสดงในรูปที่ 15 และถอดรหัสได้เป็นสายโพลีเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 112 หน่วย เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ชั้นกลางของยีน LvFReP ของกุ้งขาวที่โคลนได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต่าง ๆ ที่มีอยู่ในธนาคารยีนโดยใช้โปรแกรม Blastx พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ชั้นกลางของยีน LvFReP มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) กับ ficolin-2 จากหอยนางรม *Crassostrea gigas* (EKC20609.1) มากที่สุด คือ 54% (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)

/Blast.cgi วันที่สืบค้น 25/02/57) และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของ LvFReP ไปเปรียบเทียบกับ FmFReP จากกิ้งแซบวัย *F. merguensis* (สุทธิรักษ์, 2556, ยังไม่เผยแพร่) พบว่ามีความเหมือนมากถึง 93% (รูปที่ 16) จากผลการทดลองสามารถยืนยันได้ว่ายีนชิ้นกลางของ LvFReP ที่โคลนได้เป็นยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนจากกิ้งขาว นอกจากนี้เมื่อทำการวิเคราะห์โครงสร้างของยีนชิ้นกลางด้วยโปรแกรม Blastx พบว่ามีโดเมนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนอยู่ภายในโครงสร้างด้วย 1 โดเมน (รูปที่ 17) ซึ่งแสดงว่า LvFReP เป็นโปรตีนที่จัดอยู่ในกลุ่ม FReD superfamily ซึ่งมีบริเวณสำคัญที่พบคือ fibrinogen-related domain (FReD)



รูปที่ 14 แบบแผน DNA ชิ้นกลางใน 1% Agarose gel electrophoresis ของยีน LvFReP ที่ได้จากการทำ PCR

แถวที่ 1 100 bp DNA ladder marker

แถวที่ 2 PCR product ชิ้นกลางของยีน LvFReP

```

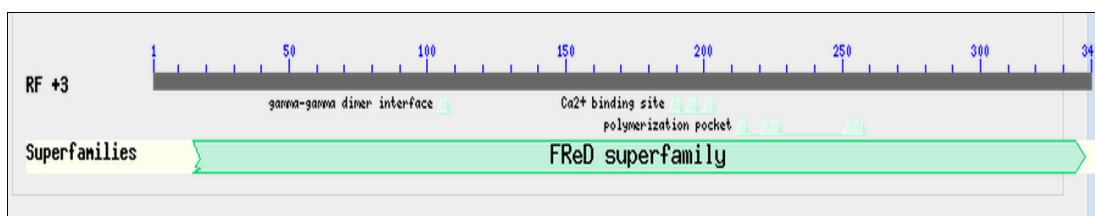
1 GC
3 CAGAGCCTGAACCAGATCCGCTTCGACCTGGTTCGACTTCGAGGGCGAGTCGCGCTGGGCC
  Q S L N Q I R F D L V D F E G E S R W A
63 AAGTACGACTTCTTCTTCGTGCACGACAAGAGCGACTCCTACAAGCTCGAAGTGAACCAT
  K Y D F F F V H D K S D S Y K L E V N H
123 TACAGCGCGGATGCCGAAGACTCCTTCACAGCCCACAGCGGGGCATGGTTTTCCACCAAG
  Y S G D A E D S F T A H S G A W F S T K
183 GACCGAGACCTTGACATGGCGGACTCGAGCTGCGCAGCATCGTACAAGGGCGGCTGGTGG
  D R D L D M A D S S C A A S Y K G G W W
243 TACAAGAAGTGCCATTCGACCAATCTCAACGGCTTGACCACAGGGGGCACCACGAGTCG
  Y K K C H S T N L N G L Y H R G H H E S
303 TATGCAGATGGTATTAAGTGGTATGATTGGCACGGACA
  Y A D G I N W Y D W H G

```

รูปที่ 15 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน LvFReP ชั้นกลางของกุ้งขาว

		1	50
FmFReP	(1)	QSLNQIRFDLADFEGESRWAKYDFFYVHDKNSYKLEVNSYSGDAQDSFT	
LvFReP	(1)	QSLNQIRFDLADFEGESRWAKYDFFYVHDKNSYKLEVNSYSGDAQDSFT	
Consensus	(1)	QSLNQIRFDLADFEGESRWAKYDFFYVHDKNSYKLEVNSYSGDAQDSFT	
		51	100
FmFReP	(51)	SHSGNRFSTKDRDHDLADSNCAQSYKGAWWYTKCHATNLNGVYHRGHHS	
LvFReP	(51)	SHSGNRFSTKDRDHDLADSNCAQSYKGAWWYTKCHATNLNGVYHRGHHS	
Consensus	(51)	SHSGNRFSTKDRDHDLADSNCAQSYKGAWWYTKCHATNLNGVYHRGHHS	
		101	112
FmFReP	(101)	YADGINWFDWHG	
LvFReP	(101)	YADGINWFDWHG	
Consensus	(101)	YADGINWFDWHG	

รูปที่ 16 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน LvFReP ชั้นกลางของกุ้งขาวกับลำดับกรดอะมิโนของยีน FmFReP จากกุ้งแชบ๊วย

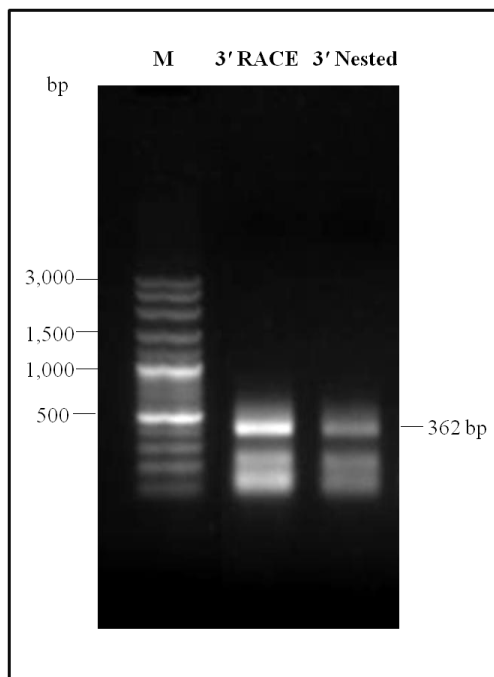


รูปที่ 17 โดเมนอนุรักษ์ (Fibrinogen-related domain) ของยีน LvFReP ของกุ้งขาว

## 1.4 การเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน LvFREP ทางด้านปลาย 3' และ 5'

### 1.4.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 3' ของยีน LvFREP

เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน LvFREP ที่โคลนได้จากข้อ 1.3 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่สมบูรณ์ ดังนั้นจึงทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาย 3' ด้วยเทคนิค RACE จากการเตรียม cDNA สายแรก ดังวิธีการข้อ 5.11.1 แล้วทำการเพิ่มจำนวน DNA ทางด้านปลาย 3' โดยใช้ไพรเมอร์ 3' RACE-F (LvFREP, GSP) สำหรับเป็น forward primer และ GeneRacer™ 3' สำหรับเป็น reverse primer ในการเพิ่มปริมาณ DNA ด้านปลาย 3' ในรอบแรก และเพื่อเป็นการยืนยันผล PCR จึงใช้ไพรเมอร์ 3' RACE-F (LvFREP, GSP) และ GeneRacer™ 3' Nested ในการเพิ่มปริมาณ DNA ด้านปลาย 3' โดยใช้ผลผลิตของการทำ PCR ในรอบแรกเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ด้วยวิธี Nested PCR ซึ่งจากการเพิ่มปริมาณ DNA และวิเคราะห์ผล PCR ด้วย 1% agarose gel electrophoresis พบแถบ DNA ขนาดประมาณ 400 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 18 ทำการสกัดแถบ DNA ที่เพิ่มจำนวนได้ออกจากเจล เชื่อมเข้ากับ DNA พาหะ pGEM®-T Easy แล้วจึงนำเข้าสู่ competent cells ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ทำการสกัดพลาสมิดและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่โคลนได้ พบว่า DNA ด้านปลาย 3' ของยีน LvFREP มีความยาว 339 คู่เบส และมีส่วนของ poly(A) tail แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้านปลาย 3' นั้นครบถ้วนสมบูรณ์แล้วดังแสดงในรูปที่ 19 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA ชั้นกลางของยีน LvFREP ที่โคลนได้จากข้อ 1.3 มาเชื่อมต่อกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 3' ที่โคลนได้ ผลการทดลองพบว่ายีน LvFREP ที่ได้มีความยาว 600 คู่เบส



รูปที่ 18 แบบแผน DNA ใน 1% Agarose gel electrophoresis ด้านปลาย 3' ของยีน LvFReP ที่ได้จากการทำ PCR

แฉวที่ 1 100 bp DNA ladder marker

แฉวที่ 2 PCR product ด้านปลาย 3'

แฉวที่ 3 PCR product ด้านปลาย 3' Nested

```

1   CCAATCTCAA CGGCGTGTAC CACAGGGGAC ACCACGAGTC ATATGCAGAT
51  GGCATTTAACT GGTATGATTG GCACGGACAC CATTACTCCT TGAAGACAGT
101 GACCATGAAG ATCAAACCAA GATTCTAAAA GATGGTCGAA AAAATGAGAA
151 AACTGAAGGA AATGTTATTT TTGTGTGTGT TTCTTTTAAA TCTTTTAGTG
201 CTAGTGGTTG TTCAATGTTT AGAAGAGTTG GTAGTATTCT TATTAGAAAAG
251 TTGAAGTTTC TGACTAATAG TTCTTGTCOA GAACCTAAAG AATCATACTA
301 TAAAGTTACT CAAATTATAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

```

รูปที่ 19 ลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 3' ของยีน LvFReP จากการทำให้ 3' RACE



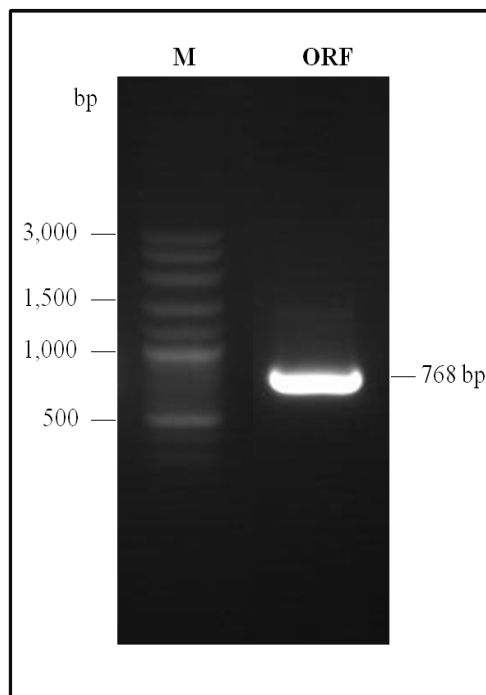
### 1.4.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5' ของยีน LvFReP

ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาย 5' ด้วยเทคนิค RACE เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน LvFReP ที่โคลนได้จากข้อ 1.3 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่สมบูรณ์ โดยการเตรียม cDNA สายแรก ดังวิธีการข้อ 5.11.1 แล้วทำการเพิ่มจำนวน DNA ทางด้านปลาย 5' โดยใช้ไพรเมอร์ GeneRacer™ 5' สำหรับเป็น forward primer และ 5' RACE-R (LvFReP, GSP) สำหรับเป็น reverse primer ในการเพิ่มปริมาณ DNA ด้านปลาย 5' ในรอบแรก และเพื่อเป็นการยืนยันผล PCR จึงใช้ไพรเมอร์ GeneRacer™ 5' Nested และ 5' RACE-R (LvFReP, GSP) ในการเพิ่มปริมาณ DNA ด้านปลาย 5' โดยใช้ผลผลิตของการทำ PCR ในรอบแรกเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ด้วยวิธี Nested PCR โดยผู้วิจัยได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะ (gene specific primer) ทั้งหมดจำนวน 9 เส้นดังแสดงในตารางที่ 11 เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA ทางด้านปลาย 5' จากผลการทดลองพบว่าไพรเมอร์ทั้ง 9 เส้น ไม่สามารถใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA ด้านปลาย 5' ของยีน LvFReP ได้ ทุกครั้งที่ทำการทดลองพบว่าแถบ DNA ที่เพิ่มจำนวนมาได้ เมื่อทำการโคลนเข้า DNA พาหะและทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาไม่ใช่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน LvFReP และจากผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน LvFReP กับ FmFReP ที่โคลนได้โดยนางสาวสุทธกร ทิพย์รัตน์ซึ่งเป็นนักวิจัยที่อยู่ในทีมวิจัยเดียวกัน (รูปที่ 16) พบว่ามีความเหมือนกันถึง 93% ผู้วิจัยคาดว่าลำดับกรดอะมิโนทั้งสายของทั้งสองยีนน่าจะมี ความเหมือนกันมาก ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะโคลนยีนในส่วนของ ORF แทน โดยออกแบบ forward primer จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ FmFReP จากกึ่งแซบวัยและ reverse primer จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่โคลนได้จากข้อ 1.4 และใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในส่วนของ ORF ของยีน LvFReP ต่อไป

### 1.5 การเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ Open reading frame (ORF) ของยีน LvFReP

#### จากกุ้งขาว

จากการเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ ORF ของยีน LvFReP ด้วยเทคนิค PCR แล้ววิเคราะห์ผลผลิตจากการทำ PCR ด้วย 1% agarose gel electrophoresis พบว่าแถบ DNA มีขนาดประมาณ 800 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 20 จากนั้นทำการสกัด DNA ออกจากเจลแล้วเชื่อมต่อด้วย DNA พาหะ pGEM®-T Easy แล้วจึงเพิ่มปริมาณ DNA ลูกผสมใน *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  เลือกโคโลนีสีขาวเพื่อสกัดพลาสมิด แล้วนำพลาสมิดส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า DNA บริเวณ ORF ของยีน LvFReP มีขนาด 768 คู่เบส



รูปที่ 20 แบบแผน DNA บริเวณ Open reading frame ของยีน LvFREP ใน 1% Agarose gel electrophoresis ที่ได้จากการทำ PCR

แถวที่ 1 100 bp DNA ladder marker

แถวที่ 2 PCR product บริเวณ open reading frame

### 1.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจน

เพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน LvFREP ได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน LvFREP ที่โคลนได้จากข้อ 1.4.1 มาเชื่อมต่อกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ORF ของยีน LvFREP ที่โคลนได้ ด้วยโปรแกรม Vector NTI ผลการทดลองพบว่ายีน LvFREP ที่ได้มีความยาว 979 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 21 โดยมีความยาวของ 3' untranslated region (3'UTR) ที่ไม่แปลเป็นกรดอะมิโนมีขนาดเท่ากับ 211 คู่เบส และมี open reading frame (ORF) จำนวน 768 คู่เบส ซึ่งถอดรหัสเป็นสายโพลีเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 255 หน่วย จากการวิเคราะห์โดยใช้ SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/service/signalP>) พบว่า LvFREP มีโปรตีนส่วนที่เป็น signal peptide 22 หน่วย และมีมวลโมเลกุล 29.24 kDa มีค่า pI เป็น 6.29 ภายในโมเลกุลของ LvFREP พบโดเมนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจน (fibrinogen-related domain) 1 โดเมน ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 219 หน่วย พบตำแหน่งที่เติมน้ำตาลแบบ N-linked glycosylation site 1 ตำแหน่ง มีลำดับกรดอะมิโนเป็น NGT (Asn-Gly-Thr) อีกทั้งมีบริเวณ  $\text{Ca}^{2+}$  binding site 1 ตำแหน่งคือ DRDHDLD และมีส่วนอนุรักษ์ของกรดอะมิโน cysteine 4 ตำแหน่ง ซึ่งสามารถเกิดเป็นพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ได้ 2 พันธะ ทำให้โครงสร้างของโปรตีน LvFREP มี

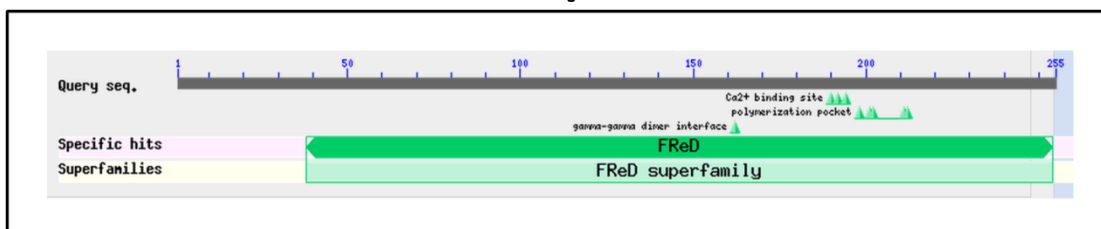
ความเสถียรมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ LvFReP ที่แยกได้จากกุ้งชากับลำดับกรดอะมิโนของของกุ้งหรือครัสเตเชียนชนิดอื่น ๆ ที่มี fibrinogen-related domain พบว่าโปรตีน LvFReP มีความเหมือนกับโปรตีน FReP จากกุ้งแชบ๊วย *F. merquiensis* มากที่สุดคือ 98% รองลงมาคือ tachylectin 5A จากแมงดาทะเล *T. tridentatus* (Q9U8W8.1) มาก คือ 48%

1	<b>ATGAGCCCAACGGCAATAGTGAGTTTGGCTGTTTCGTGGTGGCCTTGGCGACGACGGAGGGC</b>
	<u>M S P T A I V S L L F V V A L A T T E G</u>
61	CTCGCGGGAAACGGAACCGTGCTGGCGGGCTTCCCGCCCTGGGCCATCGCTTCCGCAAC
	<u>L A G N G T V L A G F P A L G H R F R N</u>
121	TGCCGCGAGGTGCAGCAGGCCATCGCCGGCAGCGCCGACGGCGTGTACGTGATCTTCCCG
	<u>C R E V Q Q A I A G S A D G V Y V I F P</u>
181	TACGACTGCTGCCCCGAGCGGCCGTGCGCGTGTGGTGGCAGATGACGAGCGACGGCGGC
	<u>Y D C C P E R P V R V W C D M T S D G G</u>
241	GGCTGGACGCTGATCCAGCGGCGCAGCAGCTACGCTGAGCAGGAGGACTTCTTCCGGACG
	<u>G W T L I Q R R D D Y A E Q E D F F R T</u>
301	TGGACCGAGTACGTCTCGGCTTCGGCAACGTGGCCAAGGACCACTGGCTCGGCTCGAC
	<u>W T E Y V L G F G N V A K D H W L G L D</u>
361	CACATCCACGCACTCACCAGCCAGAGCCTGAGCCAGATCCGCTTCGACCTGGCCGACTTC
	<u>H I H A L T S Q S L S Q I R F D L A D F</u>
421	GAGGGCGAGTCCCGCTGGGCCAAGTACGACTTCTTCTACGTGCACGACAAGAGCAACTCC
	<u>E G E S R W A K Y D F F Y V H D K S N S</u>
481	TACAAGCTCGAAGTGAACCTCCTACAGTGGCGACGCCAAGACTCCTTCACTAGCCACAGC
	<u>Y K L E V N S Y S G D A Q D S F T S H S</u>
541	GGGAATAGGTTTTCCACCAAGGATCGCGACCATGACCTGGCAGATTCAAATGCGCACAA
	<u>G N R F S T K D R D H D L A D S N C A Q</u>
601	TCGTACAAGGGCGCTTGGTGGTACACGAAATGTCACGCGACGAATCTCAACGGCGTGTAC
	<u>S Y T G A W W Y K K C H A T N L N G V Y</u>
661	TACAGGGGACACCACGAGTCATATGCAGATGGCATTAACTGGTTTGATTGGCATGGACAC
	<u>Y R G H H E S Y A D G I N W F D W H G H</u>
721	CATTACTCCTTGAAGTCAGTAACCATGAAGATCAAACCAAGATTCTAAAGATGGTCGAA
	<u>H Y S L K S V T M K I K P R F *</u>
781	AAAATGAGAAAATGAAGGAAATGTTATTTTTGTGTGTGTTTCTTTTAAATCTTTTAGTG
841	CTAGTGGTTGTTCAATGTTTAGAAGAGTTGGTAGTATTCTTATTAGAAAGTTGAAGTTTC
901	TGACTAATAGTTCTTGTCAAGAACCTAAAGAATCATACTATAAAGTTACTCAAATTATAA
961	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

รูปที่ 21 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน LvFReP จากกุ้งชาก

ลำดับกรดอะมิโนในส่วน signal peptide (ตัวเอียง), บริเวณ fibrinogen-related domain (FReD) กรดอะมิโนลำดับที่ 36-254 (ขีดเส้นใต้), ตำแหน่ง N-linked glycosylation site (สีฟ้า), บริเวณจับ  $Ca^{2+}$  (สีเขียว), บริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโน cysteine 4 ตำแหน่ง (สีเหลือง), start codon และ stop codon (ตัวหนา)

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของ LvFREP ไปทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BlastP พบว่า LvFREP มีบริเวณอนุรักษ์ 1 โดเมน ได้แก่ โดเมน FREd ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 36-254 ซึ่งทำให้ LvFREP จัดอยู่ในกลุ่ม FREd superfamily และภายในโครงสร้างของ LvFREP ยังพบบริเวณที่ใช้จับกับ  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}$  binding site) 1 ตำแหน่ง ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 188-195 ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเป็น DRDHDLDAD ดังแสดงในรูปที่ 22



รูปที่ 22 โดเมนของ LvFREP

LvFREP ประกอบด้วย 1 โดเมนคือ fibrinogen-related domain (FREd)

### 1.7 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ LvFREP ของกุ้งขาวกับกุ้งหรือสัตว์กลุ่ม ครัสเตเชียนที่มี FREd

เพื่อหาความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนจากกุ้งขาวกับกุ้งหรือสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนชนิดต่าง ๆ จึงได้ทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโดเมน FREd ของยีน LvFREP จากกุ้งขาวกับลำดับกรดอะมิโนของโดเมน FREd จาก *P. monodon* (PmMIP), *P. leniusculus* (PIFLP1, PIFLP2, PIMIP), *M. japonicas* (MjFREp1, MjFREp2), *Argopecten irradians* (Ai-FREp1, Ai-FREp2), *T. tridentatus* (TL-5A, TL-5B), *M. rosenbergii* (MrFico1, MrFico2) ที่มีรายงานในธนาคารยีน และ *F. merguensis* (FmFREp) ทำการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม ClustalW Multiple Alignment พบว่าลำดับกรดอะมิโนของ PmMIP, PIFLP1, PIFLP2, PIMIP, MjFREp1, MjFREp2, Ai-FREp1, Ai-FREp2, TL-5A, TL-5B, MrFico1, MrFico2 และ FmFREp มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ LvFREP จากกุ้งขาวอยู่ในช่วง 32-98% นอกจากนี้พบบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโน cysteine 4 ตำแหน่ง อีกทั้งพบบริเวณอนุรักษ์ของลำดับกรดอะมิโนของโดเมน FREd ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่น่าสนใจ ซึ่งบริเวณนี้จะเรียกว่า  $\text{Ca}^{2+}$  binding site โดยในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะพบกรดอะมิโนบางตำแหน่งที่แตกต่างกันออกไป (รูปที่ 23)

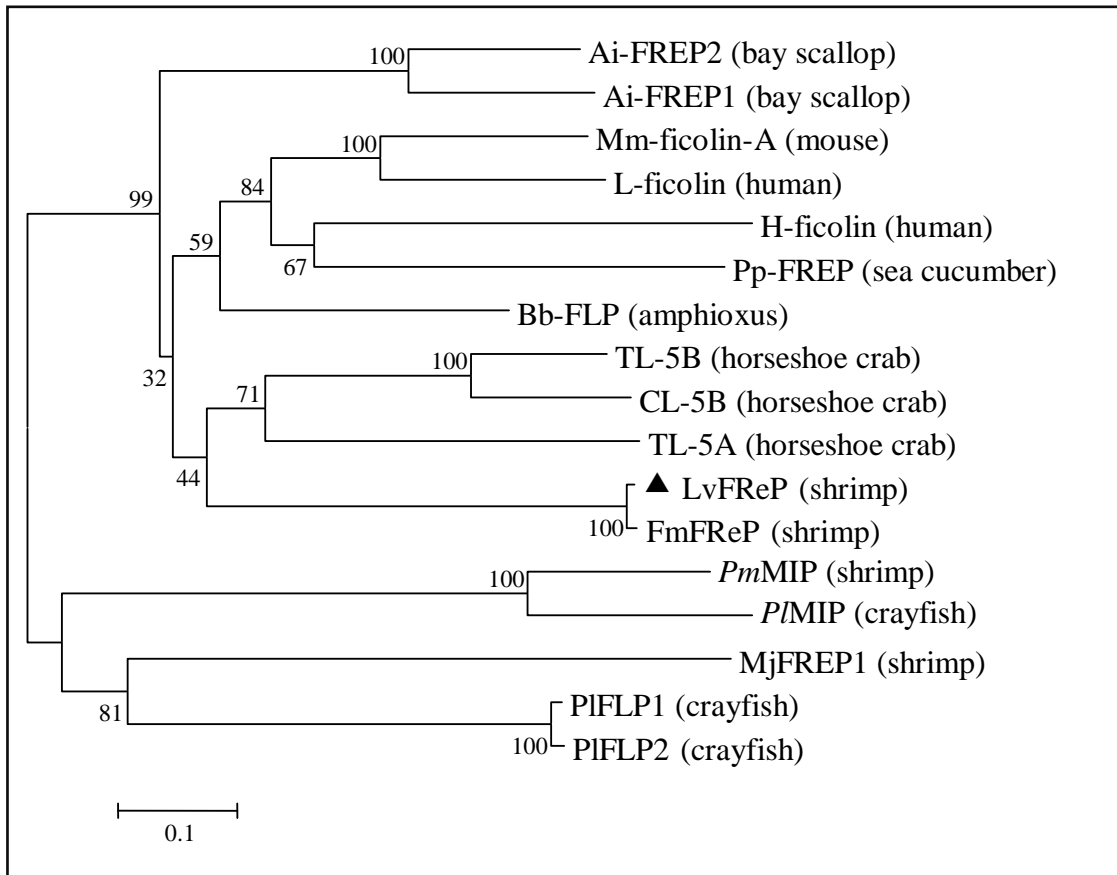
		1	*			*		60
LvFreP	(1)	HRFRNCREVQQAIA--GSADGVVVFYDCCPER-PVRVWCDMTS----	DGGGWTIIQRR					
FmFreP	(1)	HRFRNCREVQQAIA--GSADGVVVFYDCCPER-PVRVWCDMTS----	DGGGWTIIQRR					
TL-5A	(1)	PDETDCAILLNGY---RSSGGVRIWPKSWMTVG-TINVYCDMET----	DGGGWTVIQRR					
TL-5B	(1)	GLPINCATYQQGN---RTSGIYMIWPLFLNHP---ISVFCOMET----	AGGGWTVIQRR					
PlMIP	(1)	EVAELLDGTRGRTE-AIVGVYTIKPKYK----PTQVRCLEGR----	GAVGWTVILSR					
FmMIP	(1)	DIEEGQFDHIAGKNQF-ATEGVYTIKPKYK----PKKVRCELGR----	GAIQWTVILAR					
PlFLP1	(1)	DREVDCHDLFQAGH---NQSGVYQVYFYRCGRPEESVVRVWCDLEG----	EDSGWTVILAR					
PlFLP2	(1)	DREVDCHDLFQAGH---NQSGVYQVYFYRCGRPEESVVRVWCDLEG----	EDSGWTVILAR					
Ai-FREP1	(1)	CIFRDCEVDVDAGN---TESGVYTIYINRKN----AVRVWCDMET----	DGGGWTVFQRR					
Ai-FREP2	(1)	DIFRDCEVDVDAGN---TESGVYTIYINRKN----AVRVWCDMET----	DGGGWTVFQRR					
MjFREP1	(1)	MRFANCAEHFCKGV---LKDGVYEVFVKNEG---AVSAWCDMSAS----	RGGGWTVFLKR					
MjFREP2	(1)	LEVKNCLEVQNLGN---NISGIYNISSPYELCP-EHRVDVYCDMETS----	GGGWTVIQNR					
MrFico1	(1)	TRFRDCCDLRSRGR---NKSGETYTIYQTCGNAVVDVWCDMEKKEAGEGGVTVLLR						
MrFico2	(1)	QWFRDCCDLRSRGR---NKSGETYTIYQTCGNAVVDVWCDMEKKEAGEGGVTVLLR						
Consensus	(1)	PRDC DV QAG SGVY IYP K GVRVWCDMET DGGGWTVIQ R						
		61						120
LvFreP	(54)	DDYAEQ-EDFFRTWTEYVLGFGNVAKDHWLGLLHIALTSQSLSCIRFDLADFDGESRWA						
FmFreP	(54)	DDYAEQ-EDFFRTWTEYVLGFGNVAKDHWLGLLHIALTSQSLNQRFDLADFDGESRWA						
TL-5A	(53)	GNYGNPSSDYFYKPKWNYKLGFGNIEKDFWLGNDRIFALTNQRNYMRFDLKDKNDTRQA						
TL-5B	(51)	GDFGQPIQNSYQTESYKNGFGNLTKFEWLGNDLILFVLINQDSVVLRFVLEDFEGGRRYA						
PlMIP	(52)	SNGRER---FNRTYRQYQGGFGDFSEDEYIIGNEPLHRLTTWRSHQLRVVDFDQKQAVV						
FmMIP	(52)	NDGREP---FNRTYRQYKDGFGDFAQDHWLGLMLHKLTTWEPHQLRAVDFDQSKTWW						
PlFLP1	(54)	RKLAEQVN-FNRGWRDYREGFGDDETEFWIGNRVLHELTSRRPQVLRVLEGDWGESRWA						
PlFLP2	(54)	RKLAEQVN-FNRGWRDYREGFGDDETEFWIGNRVLHELTSRRPQVLRVLEGDWGESRWA						
Ai-FREP1	(50)	VNGSTD---FYRGWDDYSLGFGNLNHEFWLGNQYLRHLTSSDWYSLRVLEDFENETRYA						
Ai-FREP2	(50)	VNGSTD---FYRGWDDYSLGFGNLNHEFWLGNQYLRHLTSSDWYSLRVLEDFENETRYA						
MjFREP1	(51)	QQQDHQED-FARPWEYREGFGSIDAEYWLGLTLHKMTSAAPMTLRLEAMAFDGESRWA						
MjFREP2	(53)	DLYGAGQ-DFERPWTDYVNGFGDLSQDFWLGIRRIHALTSQSPYEMRLDMDFDGNARYA						
MrFico1	(58)	RPLGTVN-FDRGWRDYAIFGFGSEDEYWIIGNEALHALTNGATQVLRVDMTDWRESRYA						
MrFico2	(54)	RKLEQVVD-FNRGWRDYREGFGDDETEFWIGNRVLHELTSERMQTLRVDMKDWNEKAVYA						
Consensus	(61)	A Q FYR W DYR GFG P EFWLGND LH LTS LRVDL DFDGESRWA						
		121						180
								Ca <sup>2+</sup> binding site
LvFreP	(113)	KYDFYVHDKSNSYKLEVNSYSGD--AQDSFTSH---SGNRFSTDRDHDLA-DSNCAQS						
FmFreP	(113)	KYDFYVHDKNNSYKLEVNSYSGD--AQDSFTSH---SGNRFSTDRDHDLA-DSNCAQS						
TL-5A	(113)	IYQDFWLENEDYLCLHGNYSGD--AGNSFGRH---NGHNFSTDRDHDH-ETHCAQT						
TL-5B	(111)	EAVEFLVRSIEELYKMSFKYKGD--AGDSLQCH---NNMFFSTDRDNDKWK-EKNCAEA						
PlMIP	(109)	QYKIFRVAGPEDNYQLTVEFEADSAAGDGLKIH---NGMKFSTYKDDDDNKDGNCSQL						
FmMIP	(109)	QYNVFRVDGPEDDYKLTAEFEADSAAGDGLSIH---NGMKFSTYKDDDDNTRDGNCAKL						
PlFLP1	(113)	EYQTFVLEHEHDSLYRLHLSQYTG--AGDALKAH---DNMFFSTDRDNDSHGTVCANSN						
PlFLP2	(113)	EYQTFVLEHEHDSLYRLHLSQYTG--AGDALKAH---DNMFFSTDRDNDSHGTVCANSN						
Ai-FREP1	(107)	NYNVFTVANAEHGRLFTVYTG--AGDALLVG---SGNRFSAKDKDLDTW-AQNCRAEK						
Ai-FREP2	(107)	NYNIFSIKDPKDGRAFTVYKGD--AGDDMIQC---SGYRFTSKKDFDGS-SKNCAATL						
MjFREP1	(110)	EWNTFSVAGSDTQYALTVGNYSNSSTLGDPLTFSRNISSMAFSTDRDNDKLSLDCVEY						
MjFREP2	(112)	TYDSFSISNEDYRVELISFGEYLG---SDPNPDFENCAYL						
MrFico1	(117)	QYSSFVADRLHDYRLRVGTVSGT--AGDALRKH---DNMLFSTDRDNDIHDSSNCADY						
MrFico2	(113)	EYSTFMVDNADWEYRLHVGYSGT--AGDSL SYH---SMLFSTDRDNDKHSINCAAD						
Consensus	(121)	YN F V D YRL V YSGD AGDSL H GM FST DRD D NCA						
		181	*					235
LvFreP	(167)	YKGA--WWYTKCHATNLNGVYYRGHHEAYADGINWFDWHGHYSLKSVTMKIKRP						
FmFreP	(167)	YKGA--WWYTKCHATNLNGVYYRGHHEAYADGINWFDWHGHYSLKSVTMKIKRP						
TL-5A	(167)	YKGG--WWYDRCHENLNGLYLNGEHNAYADGIEWRAWKGMHYSLPQVEMKIRPV						
TL-5B	(165)	YKGG--WWYNACHSNLNGMYLRGPHEESAVGVNYYQWRGNYSLKSVSEMKIRPI						
PlMIP	(166)	FGGGGGWWTNCHVLPYGRYSV--GGNEYGGAWYFWRNVKHSLSKSLTLIRRH						
FmMIP	(166)	FGGGGGWWTNCHVLPYGRYSV--GGNEYGGAWYFWRNVKHSLSKSLTLIRRH						
PlFLP1	(168)	YHGG--FWYHACHTASPTSLYLE--KEKSTRGLNNTWHTDRTLTKVTVFIVREK						
PlFLP2	(168)	NHGG--FWYHACHTASPTSLYLE--KEKSTRGLNNTWHTDRTLTKVTVFIVREK						
Ai-FREP1	(161)	YHGA--WWYKDCRHSNLNGKYLSPPTTYANGVWYDFKGMHYSLSKSKMIRRG						
Ai-FREP2	(161)	YHGA--WWYGNCHSNLNGDYLISQYTSYATGVVWTKFKGYSYSLKSSIMIRRG						
MjFREP1	(169)	YSSGGWYVASCSDIKPTAPLTSSGRMLTLMTWTTSPQWTSLEKVRFRFRQ						
MjFREP2	(149)	WESA--WWRFSCTVHVENQDLGPNSSKKWLEVIWYWRGYSYPPKSEKIRRK						
MrFico1	(172)	YNSG--FWYKCIYASPTNPLLS--KQKSVKGIWKSEHDDWTTLKSIKFKVPA						
MrFico2	(168)	RKSG--FWYNACEHVGPTNPLLP--SAMTEKGMHWHYNNRQTLKQMSFKIKEV						
Consensus	(181)	Y GG WWY CH S PTG YL G S GV W WRGH YSLKSVTMKIRP						

**รูปที่ 23 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโดเมน FReD ของยีน LvFReP ของกุ้ง  
ชาวกุ้งหรือสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนชนิดอื่น ๆ**

TL-5A (BAA84188) และ TL-5B (BAA84189) = *T. tridentatus*, PIFLP1 (ADM89628), PIFLP2 (ADM89629) และ PIMIP (ACA28963) = *P. leniusculus*, PmMIP (EX926839) = *P. monodon*, MjFREP1 (AEM76723) และ MjFREP2 = *M. japonicus*, Ai-FREP1 (ACB29735) และ Ai-FREP2 (AHY19013) = *A. irradians*, MrFico1 และ MrFico1 = *M. rosenbergii*, FmFReP (ยังไม่เผยแพร่) = *F. merguensis* เครื่องหมาย \* แสดงบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโน cysteine

**1.8 การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน LvFReP ของกุ้งชาวกุ้ง  
สิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ**

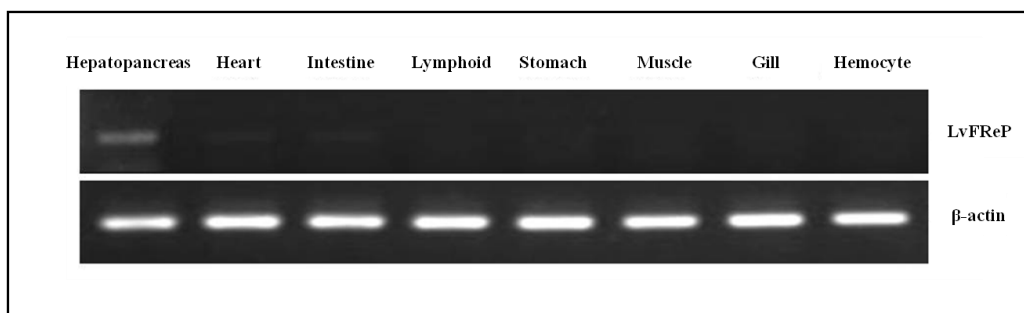
การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ของโดเมน FReD ของยีน LvFReP ในกุ้งชาวกุ้งกับสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ในกลุ่มครัสเตเชียน ซึ่งประกอบด้วยสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ 16 ชนิด ได้แก่ horseshoe crab TL-5A (BAA84188), TL-5B (BAA84189) และ CL-5B (ABI34616); *P. leniusculus* PIMIP (ACA28963), PIFLP1 (ADM89628) และ PIFLP2 (ADM89629); *P. monodon* PmMIP (EX926839); *Parastichopus parvimensis*, sea cucumber FREP (AAA29962); *Mus musculus* ficolin-A (BAA25126); *Homo sapiens*, L-ficolin (BAA08352) และ H-ficolin (NP\_003656); *A. irradians* Ai-FREP1 (ACB29735) และ Ai-FREP2 (AHY19013); *Branchiostoma belcheri*, amphioxus FLP (XP\_002604312); *M. japonicus* MjFREP1 (AEM76723) และ MjFREP2; *F. merguensis* FmFReP (ยังไม่เผยแพร่) โดยนำมาสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 5.2 โดยกำหนดให้ค่าการสุ่ม (Bootstrap) เท่ากับ 1,000 ครั้ง พบว่า Phylogenetic tree ที่สร้างได้แบ่งออกได้เป็น 2 cluster ดังรูปที่ 24 โดย cluster แรกเป็นกลุ่มของโดเมน FReD ของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน และสัตว์มีกระดูกสันหลัง ส่วนอีก cluster เป็นกลุ่มของโดเมน FReD ของกุ้งชนิดต่าง ๆ ทั้งนี้พบว่ายีน LvFReP ของกุ้งชาวกุ้งมีความใกล้เคียงทางลำดับวิวัฒนาการกับ FmFReP ของกุ้งแซบวัยมากที่สุดและจัดอยู่ในกลุ่ม cluster แรก



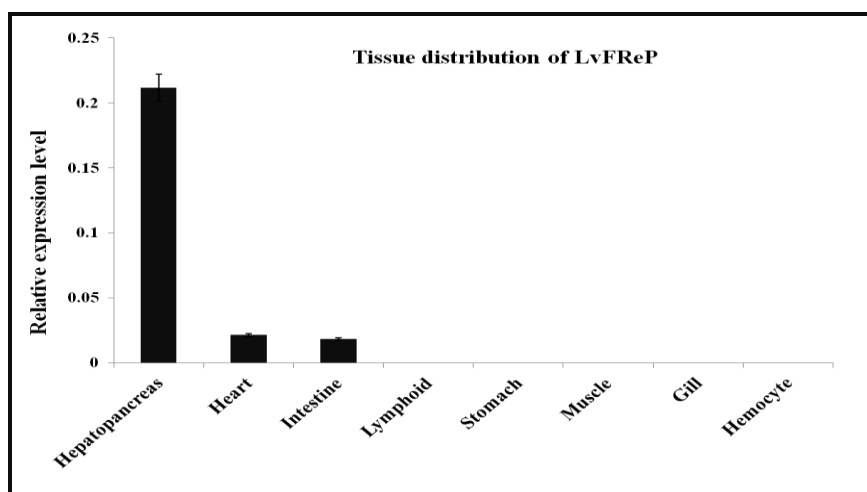
รูปที่ 24 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่างโดเมน FReD ของ LvFReP ของกุ้งชากับสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ  
วิเคราะห์ด้วย Neighbor-Joining method โดยโปรแกรม MEGA 5.2

## 2. การศึกษาการแสดงออกของยีน LvFReP ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ

ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน LvFReP ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งขาวด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ total RNA ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อของกุ้งขาว ได้แก่ ตับ หัวใจ ลำไส้ ลิมฟอยด์ กระเพาะอาหาร กล้ามเนื้อ เหงือก และฮีโมไซท์ โดยใช้ไพรเมอร์ LvFReP-F1 และ LvFReP-R1 ในการเพิ่มปริมาณ DNA วิเคราะห์ผล PCR ด้วย 1% agarose gel electrophoresis พบแถบ DNA ของ PCR product มีขนาดเท่ากับ 340 คู่เบส และพบมีการแสดงออกของยีน LvFReP มากที่สุดในตับ รองลงมาคือหัวใจและลำไส้ (รูปที่ 25) และเมื่อนำเจลที่ได้จากการทดลองไปวัดความเข้มของแถบ โดยใช้เครื่อง Gel Document ด้วยโปรแกรม Labworks 4.0 นำค่าที่วัดได้คำนวณค่าอัตราส่วนความเข้มแถบของยีน LvFReP เทียบกับยีน  $\beta$ -actin พบว่ายีน LvFReP มีการแสดงออกมากที่สุดในตับ รองลงมาคือหัวใจและลำไส้ ดังแสดงในรูปที่ 26



รูปที่ 25 การแสดงออกของ mRNA ของยีน LvFReP ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ด้วยวิธี RT-PCR เปรียบเทียบกับ  $\beta$ -actin ซึ่งใช้เป็นยีนควบคุม

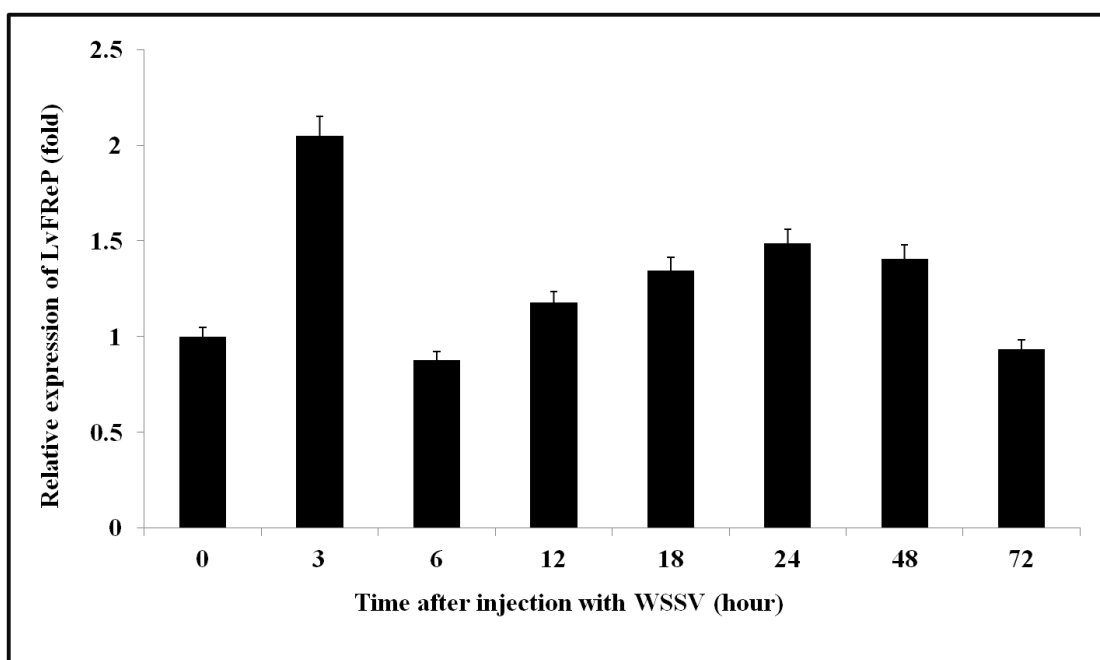


รูปที่ 26 อัตราส่วนความเข้มแถบของยีน LvFReP เทียบกับยีน  $\beta$ -actin ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งขาว



### 3. ผลการเหนี่ยวนำกุ้งด้วยจุลินทรีย์ก่อโรคต่อระดับการแสดงออกของยีน LvFReP จาก กุ้งขาว

การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน LvFReP จากตับของกุ้งขาวหลังการฉีดด้วยเชื้อ WSSV ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR โดยเปรียบเทียบกับ  $\beta$ -actin ซึ่งใช้เป็นยีนควบคุม พบว่ายีน LvFReP มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 3 คือ 2.04 เท่า และลดลงที่ชั่วโมงที่ 6 หลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ WSSV และมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอีกครั้งหลังจากชั่วโมงที่ 6 จากนั้นระดับการแสดงออกของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนจะลดลงสู่ระดับปกติในชั่วโมงที่ 72 (รูปที่ 27)



รูปที่ 27 ระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน LvFReP ในตับของกุ้งขาวหลังฉีดด้วยเชื้อ WSSV ณ ช่วงเวลาต่าง ๆ

## บทที่ 4

### วิจารณ์ผลการทดลอง

#### 1. การโคลนชิ้น DNA ของยีน LvFReP จากกุงขาว

กุงเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่มครัสเตเชีย มีกลไกการป้องกันตนเองโดยอาศัยระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ เลคตินเป็นโปรตีนในฮีโมลิมฟ์ ที่ทำหน้าที่เป็น pattern recognition proteins (PRPs) ซึ่งจัดจำองค์ประกอบที่เป็นคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์ของจุลินทรีย์ โดยมีโดเมนที่ใช้จดจำโครงสร้างของคาร์โบไฮเดรตเรียกว่า carbohydrate recognition domain (CRD) และ fibrinogen-related domain (FReD) โดยโปรตีนที่มี FReD อยู่ภายในโครงสร้างเรียกว่า โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจน (fibrinogen-related protein, FReP) เนื่องจากเลคตินที่มีการศึกษาในกุงส่วนใหญ่เป็นกลุ่มที่มีโครงสร้างประกอบด้วย CRD ในขณะที่เลคตินที่มี FReD เป็นองค์ประกอบยังมีการศึกษาน้อยมากในสิ่งมีชีวิตกลุ่มนี้และไม่พบรายงานในกุงขาว ในการศึกษาครั้งนี้ จึงได้ศึกษาโปรตีนที่มี FReD เป็นองค์ประกอบภายในโครงสร้าง โดยการโคลนยีนจากตับของกุงขาว ซึ่งให้ชื่อว่า LvFReP โดยพบว่า ยีน LvFReP มีความยาว 979 คู่เบส โดยมีส่วนของ 3' UTR 211 คู่เบส และ ORF 768 คู่เบส สามารถถอดรหัสเป็นสายโพลีเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 255 หน่วย มีความยาวของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่โคลนได้มีขนาดใกล้เคียงกับยีนอื่น ๆ ที่มี FReD เป็นองค์ประกอบ ดังแสดงในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 คุณสมบัติของยีนที่มีโดเมน FReD เป็นองค์ประกอบจากสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน

ชื่อยีน	ORF (คู่เบส)	กรดอะมิโน (หน่วย)	น้ำหนัก โมเลกุล (kDa)	pI	อ้างอิง
LvFReP	768	255	29.24	6.29	ศึกษาครั้งนี้
FmFReP	768	255	29.14	5.97	ยังไม่เผยแพร่
<i>PmMIP</i>	957	318	35.9	5.5	Anthong <i>et al.</i> , 2010
<i>PIMIP</i>	978	326	43		Söderhäll <i>et al.</i> , 2009
MjFREP1	813	270	25	5.01	Chai <i>et al.</i> , 2012
MjFREP2	954	317	36		Sun <i>et al.</i> , 2014
PIFLP1	1,335	445	47.5	5.1	Wu <i>et al.</i> , 2011
PIFLP2	1,290	430	45.7	5.4	
TL-5A	876	292	36		Gokudan <i>et al.</i> , 1999
Ai-FREP1	753	251	26.9	5.5	Zhang <i>et al.</i> , 2009c
Ai-FREP2	762	253	28.78	6.03	Yang <i>et al.</i> , 2014
MytFREP1	690	230	23.8	5.46	Gorbushin <i>et al.</i> , 2011
MytFREP2	723	241	25.4	7.81	
MrFico1	1,281	427	47.33	5.24	Zhang <i>et al.</i> , 2014
MrFico2	1,137	378	42.83	6.38	

จากการนำลำดับกรดอะมิโนของ LvFReP ของกุ้งขาว มาทำการวิเคราะห์พบว่ามี ส่วนของ signal peptide 22 หน่วย เช่นเดียวกับ *PmMIP* ของกุ้งกุลาดำ (Anthong *et al.*, 2010) PIFLP1 และ PIFLP2 (Wu *et al.*, 2011) โดยตำแหน่งตัด (cleavage site) ของ LvFReP อยู่ระหว่างกรดอะมิโน Ala<sup>22</sup> และ Gly<sup>23</sup> นอกจากนี้ LvFReP มีส่วนของกรดอะมิโนที่เป็นโดเมน FReD จำนวน 219 หน่วย คือตั้งแต่กรดอะมิโน His<sup>36</sup> จนถึง Arg<sup>254</sup> สอดคล้องกับยีนที่มีโดเมน FReD เป็นองค์ประกอบของกุ้งอื่น ๆ คือ FmFReP (ยังไม่เผยแพร่), *PmMIP* และ *PIMIP* ซึ่งมีส่วนของกรดอะมิโนที่เป็นโดเมน FReD จำนวน 219 หน่วย (Anthong *et al.*, 2010; Söderhäll *et al.*, 2009) และคล้ายกับ PIFLP1, PIFLP2 ซึ่งมีกรดอะมิโนที่เป็นโดเมน FReD 218 หน่วย (Wu *et al.*, 2011) โดยภายในโดเมน FReD ของ LvFReP ของกุ้งขาวมีกรดอะมิโนซิสเทอีน 4 หน่วย Cys<sup>41</sup>, Cys<sup>73</sup>, Cys<sup>198</sup>, Cys<sup>211</sup> ที่สามารถเกิดพันธะไดซัลไฟด์แบบภายในโครงสร้างได้ 2 พันธะ เช่นเดียวกับโปรตีนอื่น ๆ ที่มีโดเมน FReD เป็นองค์ประกอบซึ่งพบว่ามีกรดอะมิโนซิสเทอีน 4 หน่วย ที่สามารถเกิดเป็นพันธะไดซัลไฟด์ได้ 2 พันธะเช่นเดียวกันกับ FmFReP (ยังไม่

เผยแพร์), *PmMIP*, *PIMIP*, *MjFREp1*, *MjFREp2*, *PIFLP1*, *PIFLP2*, *TL-5A*, *Ai-FREp1*, *Ai-FREp2*, *MrFico1* และ *MrFico2* ซึ่งพันธะไดซัลไฟด์ดังกล่าวมีส่วนช่วยให้โครงสร้างของโดเมน *FReD* มีความเสถียรมากขึ้น (Anthonng *et al.*, 2010; Söderhäll *et al.*, 2009; Chai *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2011; Gokudan *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2009c; Yang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014) และมีตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีการเติมน้ำตาลแบบ N-linked glycosylation 1 ตำแหน่ง คือ *NGT* ซึ่งมีตำแหน่งในสายโพลีเปปไทด์คือ *Asn*<sup>24</sup> เช่นเดียวกับโปรตีนที่มีโดเมน *FReD* เป็นองค์ประกอบในกุ่มชนิดต่าง ๆ ที่ล้วนมีตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีการเติมน้ำตาลแบบ N-linked glycosylation อย่างน้อย 1 ตำแหน่ง คือ *FmFREp* มี *NNS* (ยังไม่เผยแพร์), *PmMIP* มี *NRT* (Anthonng *et al.*, 2010), *PIMIP* มี *NPS*, *NRT*, *NCS* (Söderhäll *et al.*, 2009), *MjFREp1* มี *NTS*, *NYS*, *NST*, *NIS* (Chai *et al.*, 2012), *MjFREp2* มี *NST*, *NIS*, *NIS*, *NSK* (Sun *et al.*, 2014), *Ai-FREp1* มี *NGST*, *NETR* (Zhang *et al.*, 2009c), *Ai-FREp2* มี *NGST*, *NETR*, *NVSS* (Yang *et al.*, 2014), *PIFLP1* และ *PIFLP2* มี *NQS*, *NDS*, *MrFico1* มี *NGS*, *NIS*, *NKS* และ *MrFico2* มี *NVT*, *NVS* แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่มีโดเมน *FReD* เป็นองค์ประกอบที่พบในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนเป็นไกลโคโปรตีนที่สามารถจดจำและจับกับคาร์โบไฮเดรตได้อย่างจำเพาะ

จากการนำลำดับกรดอะมิโนของ *LvFREp* ของกุ่มขาวเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนอื่น ๆ ที่มีโดเมน *FReD* เป็นองค์ประกอบ พบว่า *LvFREp* มีบริเวณอนุรักษ์ของ *Asp-rich* คือ (DXDXDXXD) และมีบริเวณอนุรักษ์ที่คาดว่าเป็นบริเวณจับกับแคลเซียมคือ *Asp*<sup>188</sup>, *Asp*<sup>190</sup>, *Asp*<sup>192</sup> และ *Asp*<sup>195</sup> ซึ่งมีความเหมือนกับ *FmFREp* ที่มีบริเวณจับกับแคลเซียม คือ *Asp*<sup>188</sup>, *Asp*<sup>190</sup>, *Asp*<sup>192</sup> และ *Asp*<sup>195</sup> (ยังไม่เผยแพร์) และมีความคล้ายคลึงกับ *MjFREp1* ของกุ่มลายเสือ ที่มีบริเวณจับกับแคลเซียม คือ *Asp*<sup>195</sup>, *Asp*<sup>197</sup>, *Asp*<sup>199</sup> และ *Ser*<sup>202</sup> (Chai *et al.*, 2012) *MjFREp2* มีบริเวณจับกับแคลเซียม คือ *Asp*<sup>252</sup>, *Asn*<sup>254</sup> และ *Asp*<sup>256</sup> (Sun *et al.*, 2014) *PmMIP* มีบริเวณจับกับแคลเซียม คือ *Asp*<sup>251</sup>, *Asp*<sup>253</sup>, *Asn*<sup>255</sup> และ *Asp*<sup>257</sup> (Anthonng *et al.*, 2010) *PIMIP* มีบริเวณจับกับแคลเซียม คือ *Asp*<sup>260</sup>, *Asp*<sup>262</sup>, *Asn*<sup>264</sup> และ *Asp*<sup>266</sup> (Söderhäll *et al.*, 2009) *PIFLP1* มีบริเวณจับกับแคลเซียม คือ *Asp*<sup>379</sup>, *Asp*<sup>381</sup>, *His*<sup>383</sup> และ *Thr*<sup>385</sup> *PIFLP2* บริเวณจับกับแคลเซียม คือ *Asp*<sup>361</sup>, *Asp*<sup>363</sup>, *His*<sup>365</sup> และ *Thr*<sup>367</sup> (Wu *et al.*, 2011) *TL-5A* มีบริเวณจับกับแคลเซียม คือ *Asp*<sup>221</sup> และ *Asp*<sup>223</sup> *TL-5B* มีบริเวณจับกับแคลเซียม คือ *Asp*<sup>242</sup> และ *Asp*<sup>244</sup> (Gokudan *et al.*, 1999) *Ai-FREp1* บริเวณจับกับแคลเซียม คือ *Asp*<sup>176</sup> และ *Asp*<sup>178</sup> (Zhang *et al.*, 2009c) และ *Ai-FREp2* มีบริเวณจับกับแคลเซียม คือ *Asp*<sup>178</sup> และ *Asp*<sup>180</sup> (Yang *et al.*, 2014)

## 2. การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ LvFReP

จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนทั้งหมดของ LvFReP ของกึ่งขากับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนอื่น ๆ ที่มีโดเมน FReD เป็นองค์ประกอบ ด้วยโปรแกรม Vector NTI พบว่าลำดับกรดอะมิโนของ LvFReP มีความเหมือนกับ FmFReP จากกึ่งแซบวัย *F. merquiensis* มากที่สุดคือ 98% จึงแสดงให้เห็นว่า LvFReP มีความสัมพันธ์กับ FmFReP ในด้านความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน

เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในส่วนของโดเมน FReD ของกึ่งขากับลำดับกรดอะมิโนบริเวณโดเมน FReD ของโปรตีนอื่น ๆ ของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน พบว่าโดเมน FReD ของ LvFReP ของกึ่งขามีความเหมือนกับโดเมน FReD ของ FmFReP มากที่สุดเป็น 98% รองลงมาคือ TL-5A, TL-5B, Ai-FREP1, Ai-FREP2, MjFREP2, PIFLP1, PIFLP2 เป็น 48%, 47%, 46%, 44%, 41%, 40% และ 39% ตามลำดับ และโปรตีนอื่น ๆ ดังแสดงในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 เปอร์เซ็นต์ความเหมือนของโดเมน FReD ของ LvFReP กับโดเมน FReD ของโปรตีนอื่น ๆ ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน

	LvFReP	FmFReP	TL-5A	TL-5B	<i>P</i> MIP	<i>Pm</i> MIP	PIFLP1	PIFLP2	Ai-FREP1	Ai-FREP2	MjFREP1	MjFREP2	MrFico1	MrFico2
LvFReP	100	98	48	47	32	37	39	39	46	44	34	41	36	35
FmFReP		100	48	47	32	36	40	39	45	44	34	41	35	35
TL-5A			100	52	28	30	36	36	45	46	28	39	33	38
TL-5B				100	32	36	42	41	47	47	31	41	34	39
<i>P</i> MIP					100	69	38	38	34	33	32	26	36	35
<i>Pm</i> MIP						100	37	37	35	35	32	29	33	35
PIFLP1							100	98	39	40	39	33	53	53
PIFLP2								100	39	40	38	34	54	53
Ai-FREP1									100	74	33	35	37	36
Ai-FREP2										100	33	37	38	36
MjFREP1											100	28	40	40
MjFREP2												100	34	32
MrFico1													100	55
MrFico2														100

### 3. การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของ LvFReP ของกุ้งขาว

จากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับกรดอะมิโนของโดเมน FReD ของ LvFReP ของกุ้งขาวกับสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ 16 ชนิด พบว่า Phylogenetic tree ที่สร้างได้แบ่งออกเป็น 2 cluster โดย cluster แรกเป็นกลุ่มของโดเมน FReD ของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนและสัตว์มีกระดูกสันหลัง ส่วน cluster ที่ 2 เป็นกลุ่มของโดเมน FReD ของกุ้งชนิดต่าง ๆ โดยพบว่ายีน LvFReP ของกุ้งขาวมีความใกล้เคียงทางลำดับวิวัฒนาการกับ FmFReP มากที่สุด และจัดอยู่ในกลุ่ม cluster แรก และแยกออกจาก cluster ของกุ้ง ซึ่งสามารถบ่งชี้ได้ว่า LvFReP เป็นเลคตินชนิดใหม่ที่มีโดเมน FReD อยู่ภายในโครงสร้างและมีความแตกต่างจากเลคตินที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้

### 4. การศึกษาการแสดงออกของยีน ของ LvFReP ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งขาว

จากการศึกษาการแสดงออกของ LvFReP mRNA ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งขาว ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้  $\beta$ -actin เป็นยีนควบคุม พบว่ายีน LvFReP มีการแสดงออกมากที่สุดในระดับ รองลงมาคือหัวใจและลำไส้ การศึกษาดังกล่าวพบว่าการแสดงออกของยีนในหลายเนื้อเยื่อ ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนที่มีรายงานในครัสเตเชียนที่มีการแสดงออกในหลายเนื้อเยื่อเช่นกัน เช่น โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนจากกุ้งแชบ๊วย *F. merguensis* ชนิด FmFReP พบการแสดงออกมากที่สุดในเนื้อเยื่อตับ รองลงมาคือเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร (ยังไม่เผยแพร่) กุ้งลายเสือ *M. japonicus* ชนิด MjFREP1 พบการแสดงออกมากในเหงือก ตับและหัวใจ (Chai et al., 2012) กุ้งนาง *P. leniusculus* ชนิด PIFLP1 พบการแสดงออกมากในเนื้อเยื่อตับและพบการแสดงออกน้อยในเนื้อเยื่อหัวใจ และลำไส้ (Wu et al., 2011) จากการเปรียบเทียบผลการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในกุ้งต่างชนิดกันพบว่าถึงแม้ว่ายีนนี้จะมีการแสดงออกในหลายเนื้อเยื่อ แต่เนื้อเยื่อหลักที่พบการแสดงออกของยีนนี้คือตับ ซึ่งเป็นอวัยวะที่มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง โดยเป็นอวัยวะหลักที่ทำหน้าที่สังเคราะห์สารน้ำหรือโปรตีนชนิดต่าง ๆ รวมทั้งมีบทบาทในการกำจัดจุลินทรีย์ ดังนั้นในการพบการแสดงออกของยีน LvFReP มากในตับ บ่งชี้ว่า LvFReP น่าจะเป็นโปรตีนที่มีความสำคัญในกลไกการป้องกันตนเองของกุ้งขาว

### 5. การศึกษาการเหนี่ยวนำกุ้งด้วยจุลินทรีย์ก่อโรคต่อระดับการแสดงออกของ LvFReP

การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจน จากตับของกุ้งขาวหลังการฉีดด้วยเชื้อ WSSV ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR พบว่ายีน LvFReP มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 3 คือ 2.04 เท่า และลดลงที่ชั่วโมงที่ 6 หลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ WSSV และมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอีกครั้งหลังจากชั่วโมงที่ 6 จากนั้นระดับการแสดงออกของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนจะลดลงสู่ระดับปกติในชั่วโมงที่ 72 การ

แสดงออกของยีน LvFReP ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหลังจากถูกกระตุ้นด้วย WSSV สอดคล้องกับการแสดงออกของยีน MjFREP1 หลังการเหนี่ยวนำด้วย WSSV ซึ่งพบว่ายีน MjFREP1 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น หลังมีการเหนี่ยวนำด้วย WSSV ที่ 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นพบการแสดงออกของ MjFREP1 ลดลงในชั่วโมงที่ 6 แล้วจึงมีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งที่ 12 ชั่วโมง หลังการเหนี่ยวนำ (Chai *et al.*, 2012) จากรูปแบบการแสดงออกหลังการเหนี่ยวนำด้วย WSSV ของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจน ในกุ้งทั้ง 2 ชนิด แสดงให้เห็นว่ารูปแบบการตอบสนองต่อเชื้อก่อโรคของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจน จะมีการแสดงออกของ mRNA เพิ่มขึ้นหลังจากได้รับ WSSV ซึ่งน่าจะเป็นผลเพื่อตอบสนองต่อเชื้อผู้บุกรุก บ่งชี้ได้ว่า LvFReP เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญในกลไกการป้องกันตนเองของกุ้งขาว



## บทที่ 5

### สรุป

จากการศึกษาการโคลนและศึกษาสมบัติของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนจากกุ้งขาว (LvFReP) รวมทั้งศึกษาการเหนี่ยวนำกุ้งด้วยจุลินทรีย์ก่อโรคต่อระดับการแสดงออกของ LvFReP ในงานวิทยานิพนธ์เรื่องนี้สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1. สามารถโคลนชิ้น DNA ของยีน LvFReP จากเนื้อเยื่อตับของกุ้งขาว โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ของยีน FReP จากสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ที่มีรายงานอยู่ในธนาคารยีน โดยได้ชิ้นยีน LvFReP บางส่วนที่มีความยาว 979 คู่เบส และมี open reading frame (ORF) จำนวน 768 คู่เบส ซึ่งถอดรหัสเป็นสายโพลีเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 255 หน่วย มีโปรตีนส่วนที่เป็น signal peptide 22 หน่วย และมีมวลโมเลกุล 29.24 kDa มีค่า pI เป็น 6.29

2. ภายในโครงสร้างของยีน LvFReP ประกอบด้วยโดเมนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจน (fibrinogen-related domain, FReD) 1 โดเมน ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 219 หน่วย พบตำแหน่งเติมน้ำตาลแบบ N-linked glycosylation site 1 ตำแหน่ง มีลำดับกรดอะมิโนเป็น NGT (Asn-Gly-Thr) ที่ตำแหน่ง 24-26 อีกทั้งมีบริเวณ  $Ca^{2+}$  binding site 1 ตำแหน่งคือ DRDHDLAD และมีส่วนอนุรักษ์ของกรดอะมิโน cysteine 4 ตำแหน่ง ซึ่งสามารถเกิดเป็นพันธะไดซัลไฟด์ ได้ 2 พันธะ นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ LvFReP กับลำดับกรดอะมิโนของกุ้งหรือสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ พบว่า โปรตีน LvFReP มีความเหมือนกับโปรตีน FmFReP จากกุ้งแชบ๊วย *F. merguensis* มาก คือ 98%

3. ลำดับกรดอะมิโนส่วนที่เป็นโดเมน FReD ของ LvFReP จากกุ้งขาว มีความเหมือนมากที่สุดกับโดเมน FReD ของ FmFReP จากกุ้งแชบ๊วย *F. merguensis* โดยมีความเหมือนเป็น 98% อีกทั้งมีความเหมือนกับ TL-5A และ TL-5B จากแมงดาทะเล *T. tridentatus* คือ 48% และ 47% ตามลำดับ

4. ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของ LvFReP Phylogenetic tree ที่สร้างได้แบ่งออกเป็น 2 cluster โดย cluster แรกเป็นกลุ่มของโดเมน FReD ของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนและสัตว์มีกระดูกสันหลัง ส่วน cluster ที่ 2 เป็นกลุ่มของโดเมน FReD ของกุ้งชนิดต่าง ๆ ซึ่ง LvFReP จากกุ้งขาวมีความใกล้เคียงทางลำดับวิวัฒนาการกับ FmFReP มากที่สุด และจัดอยู่ในกลุ่ม cluster แรก และแยกออกจาก cluster ของกุ้ง ซึ่งสามารถ

บ่งชี้ได้ว่า LvFReP เป็นเลคตินชนิดใหม่ที่มีโดเมน FReD อยู่ภายในโครงสร้างและมีความแตกต่างจากเลคตินที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้

5. LvFReP มีระดับการแสดงออกของ mRNA ในเนื้อเยื่อตับมากที่สุด รองลงมาคือหัวใจและลำไส้ ซึ่งพบว่าการแสดงออกของยีนในหลายเนื้อเยื่อ สอดคล้องกับการแสดงออกของยีน FReP ที่มีรายงานในคริสต์เขียนที่มีการแสดงออกในหลายเนื้อเยื่อเช่นกัน

6. LvFReP มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 3 คือ 2.04 เท่า และลดลงที่ชั่วโมงที่ 6 หลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ WSSV และมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอีกครั้งหลังจากชั่วโมงที่ 6 จากนั้นระดับการแสดงออกของยีน LvFReP จะลดลงสู่ระดับปกติในชั่วโมงที่ 72 หลังการเหนี่ยวนำ

## เอกสารอ้างอิง

- กิจการ ศุภมาตย์, วุฒิพร พรหมขุนทอง, ชุติมา ตันติกิตติ และ Rudolf Hoffman. 2543. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: II เซลล์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในกุ้งกุลาดำ. วารสารสงขลานครินทร์ 22 (ฉบับพิเศษ), 581-588.
- ชะลอ ลิมสุวรรณ. 2543. กุ้งไทย 2000 สู่ความยั่งยืนและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม. โรงพิมพ์เจริญรัฐการพิมพ์. กรุงเทพฯ.
- ถนอมจิตร สิริภคพร. 2556. ทิศทางการส่งออกกุ้งไทยปี 2556. ธนาคารแห่งประเทศไทย สำนักงานภาคใต้.
- ธนิทร ศรีทองสุข. 2531. ธุรกิจการเพาะและอนุบาลลูกกุ้งทะเล. ว. การประมง ปีที่ 41(4), 301-310.
- ธวัช ศรีวีระชัย และฐานันดร ทัดตานนท์. 2538. การเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยแบบพัฒนาในบ่อดิน. เอกสาร วิชาการ ฉบับที่ 44/2538 สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดนราธิวาส กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- นิชา ไพจิตร. 2545. สมบัติของเลคตินจากฮีโมลิมพ์ของกุ้งแชบ๊วย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา.
- ประจวบ หล้าอุบล. 2530. ความรู้เรื่องการเลี้ยงกุ้ง. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล. คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ภิญโญ เกียรติภิญโญ. 2545. วัธีปฏิบัติสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาวแอลล. แวนนาไม (Practical Technology for *Litopenaeus vannamei* Culture). สำนักพิมพ์เมืองเกษตรแม่กกาซีน, สมุทรปราการ.
- ลักษณะผิวไต้เปลือกและอวัยวะสร้างเม็ดเลือดของกุ้งที่เป็นโรคตัวแดงดวงขาว. 2557. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก <http://www.kunghai.com/virus.html> (วันที่สืบค้น 19 มีนาคม 2557).
- วงจรชีวิตกุ้ง. 2557. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก <http://upic.me/show/4296879> (วันที่สืบค้น 19 มีนาคม 2557).
- สมาคมอาหารแช่เยือกแข็งไทย. 2552. อุตสาหกรรมกุ้งปี 52 ตั้งเป้าลดกำลังการผลิต. AQUA BIZ. ฉบับที่ 17 ประจำเดือน มกราคม: 12-15.
- สุรินทร์ มัจฉาชีพ. 2535. สัตว์น้ำจากท้องทะเลไทย. สำนักพิมพ์แพรววิทยา. กรุงเทพฯ.
- Adema, C.M., Hertel, L.A., Miller, R.D. and Loker, E.S. 1997. A family of fibrinogen-related protein that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 8691-8696.

- Alpuche, J., Pereyra, A., Agundis, C., Rosas, C., Pascual, C., Slomianny, M.C., Vazquez, L. and Zenteno, E., 2005. Purification and characterization of a lectin from the white shrimp *Litopenaeus setiferus* (Crustacea decapoda) hemolymph. *Biochim. Biophys. Acta* 1724, 86–93.
- Angthong, P., Watthanasurorot, A., Klinbunga, S., Ruangdej, U., Söderhäll, I. and Jiravanichpaisal, P. 2010. Cloning and characterization of a melanization inhibition protein (*PmMIP*) of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 464–468.
- Banerjee, S., Chaki, S., Bhowal, J. and Chatterjee, B.P. 2004. Mucin binding mitogenic lectin from freshwater Indian gastropod *Belamya bengalensis*: Purification and molecular characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* 421, 125–134.
- Barondes, S.H. 1986. Vertebrate Lectin: Properties and function in the lectin. In: *The Lectin*, Liener, I.E. *et al.*, Eds. Academic Press Inc., New York, 437–466.
- Bauchau, A.G. 1981. Crustaceans. In: *Invertebrate Blood Cells*, Ratcliffe, N. A. and Rowley, F.F., Eds. Academic Press Inc., London, Vol. 2, 385–420.
- Bies, C., Lehr, C.-M. and Woodley, J.F. 2004. Lectin-mediated drug targeting: History and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56, 425–435.
- Bulgakov, A.A., Park, K., Choi, K.-S., Lim, H.-K. and Chob, M. 2004. Purification and characterization of a lectin isolated from the Manila clam *Ruditapes philipinarum* in Korea. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 487–499.
- Chai, Y.M., Zhu, Q., Yu, S.S., Zhao, X.F. and Wang, J.X. 2012. A novel protein with a fibrinogen-like domain involved in the innate immune response of *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol.* 32, 307–315.
- Christophides, G.K., Zdobnov, E., Barillas-Mury, C., Birney, E., Blandin, S. *et al.* 2002. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science* 298, 159–165.
- Cominetti, M.R., Marques, F.M., Lorenzini, D.M., Löfgren, S.E., Daffre, S. and Barracco M.A. 2002. Characterization and partial purification of a pectin from the hemolymph of the white shrimp *Litopenaeus schmitti*. *Dev. Comp. Immunol.* 26, 715–721.
- Costa, F.H., Valenca, N.S., Silva, A.R., Bezerra, G.A., Cavada, B.S. and Radis-Baptista, G. 2011. Cloning and molecular modeling of *Litopenaeus vannamei* (Penaeidae)

- C-type lectin homologs with mutated mannose binding domain-2. *Genet. Mol. Res.* 10, 650-664.
- Devaraj, H., Kumar, D.S., Thanissar, J. and Niranjali, S. 1995. Isolation and characterization of high molecular weight glycoproteins from embryonated eggs of *Emerita asiatica*. *Comp. Biochem. Physiol.* 110, 175-181.
- Ding, J., Umstead, T.M., Floros, J. and Phelps D.S. 2004. Factors affecting SP-A-mediated phagocytosis in human monocytic cell lines. *Respiratory Medicine* 98, 637-650.
- Drickamer, K. 1988. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domain in animal lectin. *J. Biol. Chem.* 263, 9557-9560.
- Dore, I. and C. Frimodt. 1987. *An Illustrated Guide to Shrimp of the World*. Osprey Books, Huntington, New York.
- Durand, S., Lightner, D.V., Redman, R.M. and Bonami, J.R. 1997. Ultra-structure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus (WSSV). *Dis. Aquat. Org.* 29, 205-211.
- Elola, M.T. and Fink, N.E. 1996. Purification and partial biochemical characterization of an S-type lectin from blastula embryos of *Bufo arenarum*. *Comp. Biochem. Physiol.* 115, 175-182.
- Endo, Y., Matsushita, M. and Fujita, T. 2007. Role of ficolin in innate immunity and its molecular basis. *Immunol.* 212, 371-379.
- Endo, Y., Takahashi, M. and Fujita, T. 2006. Lectin complement system and pattern recognition. *Immunol.* 211, 283-293.
- Flegel, T.W. 1997. Major viral disease of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World J. Micro. Biotechnol.* 13, 433-442.
- Gokudan, S., Muta, T., Tsuda, R., Koori, R., Kawahara, T., Seki, N., Mizunoe, Y., Wai, N.S., Iwanaga, S. and Kawabata, S. 1999. Horseshoe crab acetyl group-recognizing lectins involved in innate immunity are structurally related to fibrinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 18, 10086-10091.
- Gollas-Galvin, T., Hernandez-Lopez, J. and Vasgas-Albores, F. 1999. Prophenoloxidase from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) hemocytes. *Comp. Biochem. Physiol.* 122, 77-88.
- Gorbushin, A.M. and Lakovleva, N.V. 2011. A new gene family of single fibrinogen domain lectin in *Mytilus*. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 434-438.

- Guo, H.Z., Zou, P.F., Fu, J.P., Guo, Z., Zhu, B.K., Nie, P. and Chang, M.X. 2011. Characterization of two C-type lectin-like domain (CTLN)-containing proteins from the cDNA library of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 515-524.
- Hatakeyama, T., Ouchi, K., Kuroki, M. and Yamasaki, N. 1995. Amino acid sequence of a C-type lectin CEL-IV from the marine invertebrate *Cucumaria echinata*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59, 1314-1317.
- Janeway, Jr., C.A. and Medzhitov, R. 2002. Innate immune recognition. *Ann. Rev. Immunol.* 20, 197-216.
- Jensen, P.H., Laursen, I., Matthiesen, F. and Højrup, P. 2007. Posttranslational modifications in human plasma MBL and human recombinant MBL. *Biochim. Biophys. Acta* 1774, 335-344.
- Junkunlo, K., Prachumwat, A., Tangprasittipap, A., Senapin, S., Borwornpinyo, S., Flegel, T W. and Sritunyaluksana, K. 2012. A novel lectin domain-containing protein (LvCTLN) associated with response of the whiteleg shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* to yellow head virus (YHV). *Dev. Comp. Immunol.* 37, 334-341.
- Kilpatrick, D.C. 2002 Animal Lectins: A historical introduction and overview. *Biochim. Biophys. Acta* 1572, 187-197.
- Kocurek, J. and Horejsi, V. 1981. Defining a lectin. *Nature* 290, 188.
- Kurachi, S., Song, Z., Takagaki, M., Yang, Q., Winter, H.C., Kurachi, K. and Goldstein, I.J. 1998. Sialic acid-binding lectin from the slug *Limax flavus*: Cloning, expression of the polypeptide, and tissue localization. *Eur. J. Biochem.* 254, 217-222.
- Li, M., Li, C., Ma, C., Li, H., Zuo, H., Weng, S., Chen, X., Zeng, D., He, J. and Xu, X. 2014. Identification of a C-type lectin with antiviral and antibacterial activity from pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Dev. Comp. Immunol.* 46, 231-240.
- Lightner, D.V. and Redman, R.M. 1996. Shrimp disease and current diagnostic method. *Aquaculture* 164, 201-220.
- Liu, Y.C., Li, F.H., Dong, B., Wang, B., Luan, W., Zhang, X.J., Zhang, L.S. and Xiang, J.H. 2007. Molecular cloning, characterization and expression analysis of a putative C-type lectin (Fclectin) gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Mol. Immunol.* 44, 598-607.

- Loker, E.S., Adema, C.M., Zhang, S.M. and Kepler, T.B. 2004. Invertebrate immune systems—not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunol. Rev.* 198, 10–24.
- Lu, J. and Le, Y. 1998. Ficolins and the fibrinogen-like domain. *Immunobiology* 199, 190–199.
- Luo, T., Yang, H., Li, F., Zhang, X. and Xu, X. 2006. Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* 30, 607–617.
- Luo, T., Zhang, X.B., Shao, Z.Z. and Xu, X. 2003. PmAV, a novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon*. *FEBS Lett.* 551, 53–57.
- Ma, T.H., Benzie, J.A., He, J.G. and Chan, S.M. 2008. PmLT, a C-type lectin specific to hepatopancreas is involved in the innate defense of the shrimp *Penaeus monodon*. *J. Invert. Pathol.* 99, 332–341.
- Ma, T. H., Tiu, S. H., He, J.G. and Chan, S.M. 2007. Molecular cloning of a C-type lectin (LvLT) from the shrimp *Litopenaeus vannamei*. Early gene down-regulation after WSSV infection. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 430–437.
- Medzhitov, R. and Janeway, Jr., C.A. 1997. Innate immunity: The virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91, 295.
- Mercy, S.P.D. and Ravindranath, M.H. 1994. Hemolysis and clearance of erythrocytes in *Scylla serrata* are related to the agglutination by the native sialic Acid specific lectin. *Comp. Biochem. Physiol.* 109, 1075–1083.
- Motoh, H. 1985. Biology and Ecology of *Penaeus monodon*. Proceedings of the First International Conference on the Culture of Penaeid Prawns/Shrimps, 4–7 December 1984, Iloilo City, Philippines, 27–36.
- Munoz, M., Ce deno, R., Rodriguez, J., Van der Knaap, W. P. W., Mialhe, E. and Bachere, E. 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in hemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 191, 89–107.
- Perez-Farfante, I. and Kensley, B. 1997. Penaeoid and Sorgestiod Shrimp and Prawns of the World. Key and Diagnoses for the Family and Genera. *Memories du Museum National. Paris.*
- Raley, N.G., Heryet, A.R., Lu, J., Reid, K.B. and Fleming, K.A. 1991. Mannan-binding protein in human liver. *J. Immunol. Methods* 141, 73–79.

- Ramirez-Gomez, F., Ortiz-Pineda, P.A., Rivera-Cardona, G. and Garcia-Ararras, J.E. 2009. LPS-induced genes in intestinal tissue of the sea cucumber *Holothuria glaberrima*. PLoS ONE. 4, e6178.
- Ratanapo, S. and Chulavatnatol, M. 1990. Monodin, A new sialic acid specific lectin from black tiger prawn (*Penaeus monodon*). Comp. Biochem. Physiol. 97, 515-520.
- Ratanapo, S. and Chulavatnatol, M. 1992. Monodin-induced agglutination of *V. vulnificus*, A major infective bacterium in black tiger prawn (*Penaeus monodon*). Comp. Biochem. Physiol. 102, 855-859.
- Rattanaporn, O. and Utarabhand, P. 2011. Molecular cloning of a C-type lectin with two CRD domains from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis*: Early gene-up regulation after *Vibrio harveyi* infection. J. Invert. Pathol. 106, 196-204.
- Rego, R.O., Hajdusek, O., Kovar, V., Kopacek, P., Grubhoffer, L. and Hypsa, V. 2005. Molecular cloning and comparative analysis of fibrinogen-related proteins from the soft tick *Ornithodoros moubata* and the hard tick *Ixodes ricinus*. Insect Biochem. Mol. Biol. 35, 991-1004.
- Rego, R.O., Kovar, V., Kopacek, P., Weise, C., Man, P., Sauman, I. and Grubhoffer, L. 2006. The tick plasma lectin, Dorin M, is a fibrinogen-related molecule. Insect Biochem. Mol. Biol. 36, 291-299.
- Rittidach, W. 2006. Characterization of sialic acid-specific lectin in the hemolymph of banana shrimp (*Penaeus merquiensis*). Ph.D. Thesis in Biochemistry, Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand.
- Rittidach, W., Pajit, N. and Utarabhand, P. 2007. Purification and characterization of a lectin from the banana shrimp *Fenneropenaeus merquiensis* hemolymph. Biochem. Biophys. Acta 1170, 106-114.
- Sharon, N. 1977. Lectins. Sci. American 236, 108-119.
- Sharon, N. and Lis, H. 1995. Lectins, protein with a sweet tooth function in cell recognition. Essays in Biochemistry 30, 59-75.
- Shi, X.Z., Wang, L., Xu, S., Zhang, X.W., Zhao, X.F., Vasta, G.R. and Wang, J.X. 2014. A Galectin from the Kuruma Shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) Functions as an Opsonin and Promotes Bacterial Clearance from Hemolymph. PLoS ONE. 9, e91794.



- Söderhäll, I., Wu, C., Novotny, M., Lee, B.L. and Söderhäll, K. 2009. A novel protein acts as a negative regulator of prophenoloxidase activation and melanization in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J. Biol. Chem.* 284, 6301–6310.
- Söderhäll, K. and Cerenius, L. 1992. Crustacean Immunity. *Annu. Rev. Fish Dis.* 2, 3–23.
- Söderhäll, K. and Cerenius, L. 1998. Role of the prophenoloxidase activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 23–28.
- Song, K.K., Li, D.F., Zhang, M.C., Yang, H.G., Ruan, L.W. and Xu, X. 2010. Cloning and characterization of three novel WSSV recognizing lectins from shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol.* 28, 596–603.
- Song, Y.L. and Hsieh, Y. T. 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal of substances: analysis of reactive oxygen species. *Dev. Comp. Immunol.* 18, 201–209.
- Sun, J., Wang, L., Wang, B., Zhenyu, G., Liu, M., Jiang, K. and Luo, K. 2007. Purification and characterisation of a natural lectin from the serum of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Mol. Immunol.* 23, 292–299.
- Sun, J.J., Lan, J.F., Shi, X.Z., Yang, M.C., Yang, H.T., Zhao, X.F. and Wang, J.X. 2014. A fibrinogen-related protein (FREP) is involved in the antibacterial immunity of *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol.* 39, 296–304.
- Sun, Y.D., Fu, L.D., Jia, Y.P., Du, X.J., Wang, Q., Wang, Y.H., Zhao, X.F., Yu, X.Q. and Wang, J.X. 2008. A hepatopancreas-specific C-type lectin from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* exhibits antimicrobial activity. *Mol. Immunol.* 45, 348–361.
- Suzuki, T. and Mori, K. 1989. A galactose-specific lectin from the hemolymph of the pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 92, 455–462.
- Takagi, T., Nakamura, A., Deguchi, R. and Kyojuka, K.I. 1994. Isolation, characterization, and primary structure of three major proteins obtained from *Mytilus edulis* sperm. *J. Biochem. Tokyo* 116, 598–605.
- Tsuboi, I., Yanagi, K., Matsukawa, M., Kubota, H. and Yamakawa, T. 1996. Isolation of a novel lectin from the hemolymph of horseshoe crabs *Limulus polyphemus* and its hemagglutinating properties. *Comp. Biochem. Physiol.* 113, 137–142.
- Turner, M.W. 2003. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Molec. Immunol.* 40, 423–429.

- Umetsu, K., Yamashita, K. and Suzuki, T. 1991. Purification and carbohydrate-binding specificities of a blood 87type B binding lectin from hemolymph of a crab *Charybdis japonica*. *J. Biochem.* 109, 718-721.
- Utarabhand, P., Rittidach, W. and Paijit, N. 2007. Bacterial agglutination by sialic acid-specific lectin in the hemolymph of the banana shrimp, *Penaeus (Fenneropenaeus) merquiensis*. *Science Asia* 33, 41-46.
- Van Hulten, M.C. and Vlak, J.M. 2001. Identification and Phylogeny of a Protein Kinase Gene of White Spot Syndrome Virus. *Virus Genes* 22, 201-207.
- Van Hulten, M.C., Westenberg, M., Goodall, S.D. and Vlak, J.M. 2000a. Identification of Two Major structural proteins of White spot syndrome virus of shrimp. *Virology* 266, 227-236.
- Van Hulten, M.C., Goldbach, R.W. and Vlak, J.M. 2000b. Three functionally diverged major structural proteins of White spot syndrome virus evolved by gene duplication. *J. General Virol.* 81, 2525-2529.
- Van Hulten, M.C., Tsai, M.F., Shipper, C.A., Lo, C.F., Kou, G.H. and Vlak, J.M. 2000c. Analysis of genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeats regions. *J. General Virology* 81, 307-316.
- Van Hulten, M.C., Witteveldt, J., Snippe, M. and Vlak, J.M. 2001a. White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. *Virology* 285, 228-233.
- Van Hulten, M.C. 2001b. Virion composition and genomics of White Spot Syndrome Virus of Shrimp. Wageningen University dissertation no. 3081: <http://www.agralin.nl/wda/abstracts/ab3081.html> (วันที่สืบค้น 14 มีนาคม 2002).
- Vazquez, L., Masso, F., Rosas, P., Montano, L.F. and Zenteno, E. 1993. Purification and characterization of a lectin from *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea, Decapoda) hemolymph. *Comp. Biochem. Physiol.* 105, 617-623.
- Vazquez, L., Lanz, H., Montano, L.F. and Zenteno, E. 1994. Biological activity of the lectin from *Macrobrachium Rosenbergii*, In: *Lectins, biology biochemistry, clinical chemistry*, Van Driessche, E. and Bog-Hansen, T.C., Eds. Textop, Hellerup, Denmark, Vol. 10, pp 261-265.

- Vlak, J.M. 2001. Wageningen University and Reserch Centre pubilishes largest genetic code of an animal virus: [http://www.plant.wageningen-ur.nl/news/2001-14\\_en.htm](http://www.plant.wageningen-ur.nl/news/2001-14_en.htm) (วันที่สืบค้น 28 พฤษภาคม 2002).
- Wang, H., Song, L., Li, C., Zhao, J., Zhang, H., Ni, D. and Xu, W. 2007. Cloning and characterization of a novel C-type lectin from zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Mol. Immunol.* 44, 722-731.
- Wang, Q., Poulos B.T. and Lightner D.V. 2000. Protein analysis of geographic isolates of shrimp White spot syndrome virus. *Arch. Virol.* 145, 263-274.
- Wang, X., Rocheleau, T.A., Fuchs, J.F., Hillyer, J.F., Chen, C. and Christensen, B.M. 2004. A novel lectin with a fibrinogen-like domain and its potential involvement in the innate immune response of *Armigeres subalbatus* against bacteria. *Insect Mol. Biol.* 13, 273-282.
- Wang, X.W. and Wang, J.X. 2013. Diversity and multiple functions of lectins in shrimp immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 39, 27-38.
- Wang, X.W., Xu, W.T., Zhang, X.W., Zhao, X.F., Yu, X.Q. and Wang, J.X. 2009a. A C-type lectin is involved in the innate immune response of Chinese white shrimp. *Fish Shellfish Immunol.* 27, 556-562.
- Wang, X.W., Zhang, X.W., Xu, W.T., Zhao, X.F. and Wang, J.X. 2009b. A novel C-type lectin (Fc-Lec4) facilitates the clearance of *Vibrio anguillarum* in vivo in Chinese white shrimp. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 1039-1047.
- Wei, X.M., Liu, X.Q., Yang, J.M., Fang, J.H., Qiao, H.J., Zhang, Y. and Yang, J.L. 2012. Two C-type lectins from shrimp *Litopenaeus vannamei* that might be involved in immune response against bacteria and virus. *Fish Shellfish Immunol.* 32, 132-140.
- Wootton, E.C., Dyrinda, E.A., Pipe, R.K. and Ratcliffe, N.A. 2003. Comparisons of PAH-induced immunomodulation in three bivalve molluscs. *Aquat. Toxicol.* 65, 13-25.
- Wu, C., Söderhäll, K. and Söderhäll, I. 2011. Two novel ficolin-like proteins act as pattern recognition receptors for invading pathogens in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Proteomics* 11, 2249-2264.
- Xu, W.T., Wang, X.W., Zhang, X.W., Zhao, X.F., Yu, X.Q. and Wang, J.X. 2010. A new Ctype lectin (FcLec5) from the Chinese white shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Amino Acids* 39, 1227-1239.

- Yang, C., Wang, L., Zhang, H., Wang, L., Huang, M., Sun, Z., Sun, Y. and Song, L. 2014. A new fibrinogen-related protein from *Argopecten irradians* (AiFREP-2) with broad recognition spectrum and bacteria agglutination activity. *Fish Shellfish Immunol.* 38, 221-229.
- Yang, H., Luo, T., Li, F., Li, S. and Xu, X. 2007. Purification and characterisation of a calcium-independent lectin (PjLec) from the haemolymph of the shrimp *Penaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 88-97.
- Yu, X.Q., Zhu, Y.F., Ma, C., Fabrick, J.A. and Kanost, M.R. 2002. Pattern recognition proteins in *Manduca sexta* plasma. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1287-1293.
- Zenteno, R., Vazquez, L., Martinez-Cairo, S., Bouquelet, S., Agundis, C. and Zenteno, E. 2000. Identification of lectin isoforms in juvenile freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii* (DeMan, 1879). *Glycoconj. J.* 17, 339-347.
- Zhang, S., Leonard, P.M., Adema, C.M. and Loker, E.S. 2001b. Parasite-responsive IgSF members in the snail *Biomphalaria glabrata*: characterization of novel genes with tandemly arranged IgSF domains and a fibrinogen domain. *Immunogenetics* 53, 684-694.
- Zhang, X., Xu, X. and Hew, C. L. 2001a. The structure and function of a gene encoding a basic peptide from prawn white spot syndrome virus. *Virus Research* 79, 137-144.
- Zhang, X.W., Xu, W.T., Wang, X.W., Mu, Y., Zhao, X.F., Yu, X.Q. and Wang, J.X. 2009a. A novel C-type lectin with two CRD domains from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* functions as a pattern recognition protein. *Mol. Immunol.* 46, 1626-1637.
- Zhang, Y., Qiu, L., Song, L., Zhang, H., Zhao, J., Wang, L., Yu, Y., Li, C., Li, F., Xing, K. and Huang, B. 2009b. Cloning and characterization of a novel C-type lectin gene from shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 183-192.
- Zhang, H., Chen, L., Qin, J., Zhao, D., Wu, P., Qin, C., Yua, N. and Li, E. 2011. Molecular cloning, characterization and expression of a C-type lectin cDNA in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Fish Shellfish Immunol.* 31, 358-363.
- Zhang, H., Wang, L.L., Song, L.S., Song, X.Y., Wang, B., Mu, C.K. and Zhang, Y. 2009c. A fibrinogen-related protein from bay scallop *Argopecten irradians*

involved in innate immunity as pattern recognition receptor. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 56–64.

- Zhang, X.W., Wang, X.W., Huang, Y., Hui K.M., Shi, Y.R., Wang, W. and Ren, Q. 2014. Cloning and characterization of two different ficolins from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Dev. Comp. Immunol.* 44, 359–69.
- Zhao, Z.Y., Yin, Z.X., Xu, X.P., Weng, S.P., Rao, X.Y., Dai, Z.X., Luo, Y.W., Yang, G., Li, Z.S., Guan, H.J., Li, H.D., Chan, H.M., Yu, X.Q. and He, J.G. 2009. A Novel C-Type Lectin from the Shrimp *Litopenaeus vannamei* Possesses Anti-White Spot Syndrome Virus Activity. *J. Virol.* 83. 347–356.

**ภาคผนวก**

## ตารางกรดอะมิโน

กรดอะมิโน	ตัวย่อ 3 ตัว	ตัวย่อ 1 ตัว
Glycine	Gly	G
Alanine	Ala	A
Valine	Val	V
Leucine	Leu	L
Isoleucine	Ile	I
Proline	Pro	P
Phenylalanine	Phe	F
Tryptophan	Trp	W
Methionine	Met	M
Histidine	His	H
Serine	Ser	S
Threonine	Thr	T
Cysteine	Cys	C
Tyrosine	Tyr	Y
Asparagine	Asn	N
Glutamine	Gln	Q
Aspartic acid	Asp	D
Glutamic acid	Glu	E
Lysine	Lys	K
Arginine	Arg	R

