รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง โปรตีนลูกผสม S3a ในการป้องกันโรคกุ้ง

Recombinant protein S3a in prevention shrimp diseases

คณะผู้วิจัย

นางสาวปัญชลิกา เดชะมาก

รศ. ดร. วิไลวรรณ โชติเกียรติ

หน่วยงานต้นสังกัด สถานวิจัยจีโนมและชีวสารสนเทศ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556-2557(รหัสโครงการวิจัย 2556A11502110)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนงบประมาณในการทำวิจัย ด้วยงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556-2557 ในครั้งนี้ และขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้อนุเคราะห์วัสดุอุปกรณ์และสถานที่ในการวิจัย ขอกราบขอบคุณ รศ. ดร. วิไลวรรณ โชติเกียรติ ที่คอยให้คำปรึกษา ชี้แนะ ในการทำวิจัย สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการดำเนินงานการวิจัยมาโดยตลอด

ปัญชลิกา เดชะมาก

บทคัดย่อ

จากการพบการแสดงออกของยีน RPS3a สูงขึ้นในกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวแวนนาไมที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว การศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการผลิตโปรตีนและดีเอ็นเอลูกผสมไรโบโซมอลโปรตีน S3a (His-RPS3a) ในส่วนของโปรตีนนำไปทำให้บริสุทธิ์ได้โปรตีน His-RPS3a ขนาด 33 kDa แล้วฉีดโปรตีน His-RPS3a ปริมาณ 1, 10, 20 ไมโครกรัม/ตัว พบว่ายีนในระบบภูมิคุ้มกันได้แก่ ยีนโปรฟีนอลออกซิเดส(prophenoloxidas, proPO) และยีนกระตุ้นกระบวนการฟาโกไซโตซิส(phagocytosis activating protein, PAP) พบว่ายีนมีการแสดงออกเมื่อศึกษาโดยเทคนิค real-time PCR ในยีน PAP เพิ่มขึ้นเป็น 4.1 เท่า เมื่อได้รับโปรตีน 1 ไมโครกรัม/ตัว และยีน proPO เพิ่มขึ้น 5.3 เท่า เมื่อได้รับโปรตีน 20 ไมโครกรัม/ตัว การศึกษาในกุ้งขาว(*Litopenaeus vannamei)* ต่อการต้านทานโรคตัวแดงดวงขาว เมื่อได้รับการฉีดด้วยโปรตีน His-RPS3a ปริมาณ 10, 20, 40 ไมโครกรัม/ตัว พบว่าการให้ไวรัส WSSV หลังการให้โปรตีน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำให้อัตราการมีชีวิตรอด คำนวณด้วยค่า relative percentage survival (RPS) เป็น 7%, 7% และ 20% ตามลำดับ สำหรับกลุ่มที่ให้ไวรัสหลังให้โปรตีน 72 ชั่วโมง พบอัตราการมีชีวิตรอด คำนวณด้วยค่า RPS เป็น 21.5%, 26.5% และ 30%, ตามลำดับ การใช้โปรตีน His-RPS3a ผสมอาหารปริมาณ 0.1, 1 และ 10 มิลลิกรัม/ตัว/วัน ให้ต่อเนื่องเป็นเวลา 3 และ 7 วัน พบว่าการแสดงออกของยีน prophenoloxidase (proPO) และ phagocytosis activating protein (PAP) gene ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม การทดลองในส่วนของดีเอ็นเอ(RPS3a-phMGFP) นำไปเตรียมในรูปแบบ chitosan-DNA nanoparticles และให้กุ้งกินที่ปริมาณ 25, 50 และ 75 ไมโครกรัม/ตัว/วัน หลังการให้โปรตีนเป็นเวลา 7 วัน นำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระบบภูมิคุ้มกัน พบยีน PAP เพิ่มขึ้น เมื่อได้รับดีเอ็นเอ 75 ไมโครกรัม/ตัว/วัน การศึกษาการต้านทานโรคตัวแดงดวงขาว เมื่อได้รับการ กิน chitosan-DNA nanoparticles ปริมาณ 75 ไมโครกรัม/ตัว/วัน พบว่าการให้ไวรัส WSSV หลังการให้โปรตีน เป็นเวลา 7 วัน ทำให้อัตราการมีชีวิตรอด คำนวณด้วยค่า relative percentage survival (RPS) เป็น 35% จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า RPS3a มีคุณสมบัติในการต้านทานชะลอการตายจากไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ระดับหนึ่งเท่านั้น

คำสำคัญ: ยีน โปรตีนลูกผสม กุ้ง ไรโบโซมอลโปรตีน S3a ไวรัสตัวแดงดวงขาว

Abstract

Ribosome protein S3a (RPS3a) gene expression was reported in black tiger shrimp and white shrimp which infected by white spot syndrome virus (WSSV). In this study, we produced and purified recombinant protein His-RPS3a and obtained the 33 kDa recombinant His-RPS3a protein. The purified His-RPS3a was injected in quantities of 1, 10 and 20 µg/shrimp and the shrimp were investigated for the expression of prophenoloxidase (proPO) and phagocytosis activating protein (PAP) gene by using real-time PCR. The result showed that the PAP gene expression increased 4.1 times when the His-RPS3a protein was injected at 1 µg/shrimp and the proPO gene expression increased 5.3 times when the His-RPS3a at 20 µg/shrimp was injected. In addition, to test for the resistance to WSSV of the shrimp, the shrimp were injected by 10, 20 and 40 µg/shrimp of the His-RPS3a, challenged with WSSV and cultured for 15 days. The result showed that the relative percentage survival (RPS) of the WSSV challenged shrimp after injected with His-RPS3a protein for 48 hours, were 7%, 7% and 20%, respectively. While the RPS of the WSSV challenged shrimp after injected with the His-RPS3a for 72 hours, were 21.5%, 26.5% and 30%, respectively. The study expression gene in immune of white shrimp (*Litopenaeus vannamei)* with shrimp feed mix ribosomal protein S3a (His-RPS3a) at 0.1, 1, 10 mg/shrimp culture for 3 and 7 day. The result showed that proPO and PAP gene not expression higher more than control group. The RPS3a-phMGFP be prepared in the form of chitosan-DNA nanoparticles. The shrimp feed the amount of DNA at 25, 50 and 75 mg / shrimp / day for 7 days. The result showed that PAP gene expression higher more than control group at 75 mg / shrimp / day. To test for the resistance to WSSV of the shrimp, the shrimp were feed by at 75 mg / shrimp / day of RPS3a-phMGFP for 7 days, challenged with WSSV and cultured for 15 days. The result showed that the relative percentage survival (RPS) of the WSSV challenged shrimp after feed by RPS3a-phMGFP for 7 days, were 35%. These results showed that the RPS3a can delay the death of the infected shrimp. Therefore, the possible function of the RPS3a could enhance the immune system and slow down the mortality of WSSV infected shrimp.

Keywords: gene, recombinant protein, shrimp, ribosomal protein S3a, white spot syndrome virus

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	9
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	11
วิธีการทดลอง	12
ผลการทดลองและวิจารณ์การทดลอง	21
สรุปผลการทดลอง	30
เอกสารอ้างอิง	32
ภาคผนวก	34

สารบัญรูปภาพ

รูปภาพที่ **หน้า**

1. แสดงการวิเคราะห์การแสดงออกและการทำบริสุทธิ์ของโปรตีนลูกผสม His-RPS3a ด้วย 12% SDS-PAGE ที่ย้อมด้วยสี coomassie brilliant blue (A) และแสดงแถบของโปรตีนลูกผสม His-RPS3a โดยเทคนิค Western blotting (B) 21

2. แสดงระดับการแสดงออกของยีน PAP (A) และยีน proPO (B) ในเลือดกุ้งขาวที่ไม่ได้รับและได้รับโปรตีน His-RPS3a โดยมียีน β-actin เป็นตัวควบคุมภายใน (n=5) 22

3. แสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของกุ้งขาวหลังจากได้รับการฉีดโปรตีน RPS3a ปริมาณ ปริมาณ 10, 20, และ 40 ไมโครกรัม/ตัว และให้เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวหลังการให้โปรตีน 48 ชั่วโมง 23

4. แสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของกุ้งขาวหลังจากได้รับการฉีดโปรตีน RPS3a ปริมาณ ปริมาณ 10, 20, และ 40 ไมโครกรัม/ตัว และให้เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวหลังการให้โปรตีน 72 ชั่วโมง 24

5. RT-PCR ของ ของยีน Actin(A), PAP(B) และ proPO(C) จากเลือดกุ้งขาวหลังจากกินอาหารผสมโปรตีน His-RPS3a เป็นเวลา 3 วัน ที่ความเข้มข้นต่างๆ 26

6. RT-PCR ของ ของยีน Actin(A), PAP(B) และ proPO(C) จากเลือดกุ้งขาวหลังจากกินอาหารผสมโปรตีน His-RPS3a เป็นเวลา 7 วัน ที่ความเข้มข้นต่างๆ 27

7. RT-PCR ของยีน Actin(A), PAP(B) และ proPO(C) จากเลือดกุ้งขาวหลังจากกิน chitosan-RPS3a nanoparticles เป็นเวลา 7 วัน ที่ความเข้มข้นต่างๆ 28

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	เปอร์เซ็นต์การตายและค่า RPS ของกุ้งขาวหลังจากได้รับการฉีดด้วยโปรตีน RPS3a ปริมาณ 10, 20, และ 40 ไมโครกรัม/ตัว และให้เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวหลังการให้โปรตีน 48 ชั่วโมง	24
2.	เปอร์เซ็นต์การตายและค่า RPS ของกุ้งขาวหลังจากได้รับการฉีดด้วยโปรตีน RPS3a ปริมาณ 10, 20, และ 40 ไมโครกรัม/ตัว และให้เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวหลังการให้โปรตีน 72 ชั่วโมง (ครั้งที่ 1)	25
3.	เปอร์เซ็นต์การตายและค่า RPS ของกุ้งขาวหลังจากได้รับการฉีดด้วยโปรตีน RPS3a ปริมาณ 10, 20, และ 40 ไมโครกรัม/ตัว และให้เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวหลังการให้โปรตีน 72 ชั่วโมง (ครั้งที่ 2)	25
4.	เปอร์เซ็นต์การตายและค่า RPS ของกุ้งขาวหลังจากได้รับการกินอาหารผสม chitosan-S3a-phMGFP nanoparticles ปริมาณ 75 ไมโครกรัม/ตัว/วัน และให้เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวหลังการให้อาหารผสมดีเอ็นเอเป็นเวลา 7 วัน	29

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

%	=	percent
cDNA	=	complementary DNA
His	=	Histidine
IPTG	=	Isopropylthiogalactose
kb	=	Kilobase (s)
kDa	=	Kilodalton (s)
LB	=	Luria-Bertani (medium)
M	=	Molarity
ml	=	milliliter
mM	=	millimolar
NaCl	=	sodium chloride
µg	=	microgram
µl	=	microliter
µM	=	micromolar
OD	=	Optical density
PAGE	=	Polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	=	Polymerase chain reaction
RNA	=	Ribonucleic acid
SDS	=	Sodium dodecyl sulfate
Tm	=	melting temperature
UV	=	ultraviolet