รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การโคลนและการแสดงออกของยีน Rab11 ในกุ้งขาว *L. vannamei*

Cloning and expression of Rab11 in white shrimp *L. vannamei*

คณะนักวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราพร วรรณนา

ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา

นางสาวกุศล บุญยัง

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2560 รหัสโครงการ SCI600247S

ชื่อโครงการวิจัย

(ภาษาไทย) การโคลนและการแสดงออกของยีน Rab11 ในกุ้งขาว *L. vannamei*

(ภาษาอังกฤษ) Cloning and expression of Rab11 in white shrimp *L. vannamei*

คณะนักวิจัย และหน่วยงานต้นสังกัด

1) ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราพร วรรณนา หัวหน้าโครงการวิจัย
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพโมเลกุลและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2) ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา นักวิจัยร่วม
สถานวิจัยจีโนมและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

3) นางสาวกุศล บุญยัง นักศึกษาปริญญาโท
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพโมเลกุลและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สารบัญ

สารบัญ	หน้า
บทคัดย่อ	1
บทนำ	3
วัตถุประสงค์	4
บทตรวจเอกสาร	5
วิธีการวิจัย	14
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	22
บทสรุปผลการทดลอง	36
เอกสารอ้างอิง	37
ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะ	42
ภาคผนวก	43

รายการตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1. โปรตีน Rab ที่มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน 14-3-3 11

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.	ลักษณะการทำงานของโปรตีน Rab	5
2.	โปรตีน Rab ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการนำสารเข้าสู่เซลล์ (endocytic pathway) และขนส่งออกนอกเซลล์ (exocytic pathway)	7
3.	ตำแหน่งของโปรตีนภายในเซลล์ที่ควบคุมโดยโปรตีน 14-3-3	13
4.	ผลผลิตพีซีอาร์ของยีน LvRab11 (ORF) จากกุ้งขาว *L. vannamei*	23
5.	โดเมนสำคัญต่าง ๆ ที่พบในโปรตีน Rab11 ของสิ่งมีชีวิต	25
6.	ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของโปรตีน Rab11 ในสิ่งมีชีวิต	26
7.	การแสดงออกของยีน LvRab11 ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของกุ้งขาวปกติ	26
8.	การแสดงออกของยีน LvRab11 ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของกุ้งขาวปกติเปรียบเทียบกับกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi*	27
9.	การแสดงออกของยีน LvRab11 ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของกุ้งขาวปกติเปรียบเทียบกับกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus*	28
10.	การแสดงออกของยีน LvRab11 ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของกุ้งขาวปกติเปรียบเทียบกับกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว	29
11.	การแสดงออกและการทำบริสุทธิ์โปรตีน 6xHis-LvRab11 จากแบคทีเรีย *E. coli* BL21(DE3)	30
12.	การแสดงออกและการทำบริสุทธิ์โปรตีน GST จากแบคทีเรีย *E. coli* BL21	31
13.	การแสดงออกและการทำบริสุทธิ์โปรตีน GST-14-3-3ES จากแบคทีเรีย *E. coli* BL21	32
14.	การแสดงออกและการทำบริสุทธิ์โปรตีน GST-14-3-3EL จากแบคทีเรีย *E. coli* BL21	33
15.	ผลการวิเคราะห์ Western Blot เพื่อยืนยันการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน LvRab11 กับ 14-3-3ES และ 14-3-3EL	35

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องการโคลนและการแสดงออกของยีน Rab11 ในกุ้งขาว *L. vannamei* จะสำเร็จไม่ได้เลยหากไม่ได้รับการสนับสนุนจากทุนงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2560 ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ทรงคุณวุฒิที่ให้คำแนะนำต่างๆ ขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพโมเลกุลและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้อนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัย และขอบคุณผู้ร่วมงานวิจัยทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการทำวิจัยครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ผู้ช่วยศาสตรจารย์ ดร. วราพร วรรณนา

หัวหน้าโครงการวิจัย

บทคัดย่อ

โปรตีน Rab11 เป็นหนึ่งในกลุ่มโปรตีน Rab ซึ่งมีบทบาทในกระบวนการทางชีววิทยาภายในเซลล์ เช่น กระบวนการขนส่งภายในเซลล์ การเจริญเติบโตของเซลล์ และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น การศึกษาครั้งนี้พบยีน Rab11 ที่แยกได้จากกุ้งขาว *L. vannamei* มีขนาด 645 คู่เบส แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 214 กรดอะมิโน และโปรตีน LvRab11 ของกุ้งขาวมีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดกับโปรตีน PmRab11 ของกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) อีกทั้งยีน LvRab11 มีการแสดงออกในทุกเนื้อเยื่อของกุ้งขาวปกติ และยีน LvRab11 มีการแสดงออกลดลงในลำไส้หลังจากกุ้งติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แต่มีการแสดงออกสูงขึ้นในเฮปพาโตแพนเครียสหลังจากกุ้งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว นอกจากนี้ศึกษาปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนด้วยเทคนิค GST-Pulldown เปิดเผยว่าโปรตีน LvRab11 สามารถมีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน 14-3-3ε ของกุ้งขาวได้ทั้งสองไอโซฟอร์ม

ABSTRACT

Rab11 protein is a member in the Rab protein family and essential for some important biological processes, including intracellular vesicle trafficking, growth and immune responses. In this study, a Rab11 gene was isolated from the white shrimp, *L. vannamei*. The *LvRab11* cDNA contained an open reading frame of 645 bp encoding a polypeptide of 214 amino acids. It was of interest, that the phylogenetic analysis showed that LvRab11 was clustered with a PmRab11 of *P. monodon*. The LvRab11 was expressed in all test shrimp tissues. At 48 h after bacterial infection, the LvRab11 mRNA level was significantly decreased in the intestein, but expression level up-regulated after WSSV infection in shrimp. In addition, GST-Pulldown assays revealed that the LvRab11 interacts with 14-3-3ε proteins.