

การศึกษาบทบาทของยีน ATG14 ในกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว
The role of ATG14 in *Penaeus vannamei* upon WSSV
infection



วารลลี ตาลอูทัย 62050647

สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2565

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The role of ATG14 in *Penaeus vannamei* upon WSSV
infection

Waralee Tan-uthai 62050647



A COOPERATIVE EDUCATION SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT
FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDRUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2022

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อสหกิจศึกษา การศึกษาบทบาทของยีน ATG14 ในกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว
The role of ATG14 in *Penaeus vannamei* upon WSSV infection
ชื่อนักศึกษา นางสาววาราลี ตาลอุทัย รหัสนักศึกษา 62050647
ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา ชีววิทยา
ปีการศึกษา 2565
อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.ภัทรันดา จารีย์ (สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล)

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้
สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ประจำปีการศึกษา 2565

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.วิภาวี เดชดีศักดิ์ ประธานกรรมการ	
ดร.ภัทรันดา จารีย์ กรรมการ	Digitally signed by phattarunda.jar Date: 2023.01.08 22:44:56 +07'00' ภัทรันดา จารีย์
ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หนังสือแสดงเจตจำนงว่าด้วยการเผยแพร่ผลงาน

ข้าพเจ้า..... ดร.ภัทรันดา จารีย์..... ตำแหน่ง..... นักวิจัย.....
บริษัท..... ศูนย์วิจัยประยุกต์และพัฒนานวัตกรรมกึ่ง สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล.....
ตั้งอยู่ที่..... 25/25 ถนนพุทธมณฑลสาย 4 ศาลายา พุทธมณฑล นครปฐม 73170.....

ได้รับนักศึกษา ชื่อ..... วราลี ตาลอุทัย..... รหัสนักศึกษา..... 62050647..... ของ
สาขาวิชา..... จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม..... ภาควิชา..... ชีววิทยา..... คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เข้าร่วมโครงการสหกิจศึกษา ณ สถานที่ข้างต้น ระหว่าง
วันที่..... 2 สิงหาคม 2565..... ถึงวันที่..... 15 ธันวาคม 2565..... ข้าพเจ้าขอแสดงเจตจำนงว่าด้วยการเผยแพร่ผลงาน ดังนี้

- ข้อมูลในรายงานฉบับนี้เป็นความลับทางการค้าและเป็นลิขสิทธิ์ของบริษัท ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ในกรณีใด ๆ ทั้งสิ้น
- ข้อมูลในรายงานฉบับนี้เป็นลิขสิทธิ์ของบริษัท อนุญาตให้เผยแพร่ได้ ภายในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เพื่อประโยชน์ทางการศึกษาเท่านั้น
- ข้อมูลในรายงานฉบับนี้เป็นลิขสิทธิ์ของบริษัท อนุญาตให้เผยแพร่ออกสู่สาธารณะได้

ในกรณีที่มีการพิจารณาโครงการ/ผลงาน ดังกล่าวเข้าร่วมประกวด/แข่งขัน โครงการ/ผลงาน สหกิจศึกษาในทุก
ระดับ ข้าพเจ้าขอแสดงเจตจำนงดังนี้

- อนุญาตให้นำโครงการ/ผลงาน เข้าร่วมประกวดสหกิจศึกษาในทุกระดับ
- ไม่อนุญาตให้นำโครงการ/ผลงาน เข้าร่วมประกวดสหกิจศึกษาในทุกระดับ

Digitally signed by
phattarunda.jar
Date: 2023.01.06
19:58:05 +07'00'

ภัทรันดา จารีย์

(ลงชื่อ).....ผู้แสดงเจตจำนง

(.....ดร.ภัทรันดา จารีย์.....)

(ลงชื่อ).....*Khomyeaw Klanbut*.....ผู้แทนภาควิชา/คณะ

(.....ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์.....)

(ลงชื่อ).....*[Signature]*.....พยาน

(.....ผศ.ดร.วิภาวี เดชดีศักดิ์.....)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อสหกิจศึกษา	การศึกษาบทบาทของยีน ATG14 ในกุ่มที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว
ชื่อนักศึกษา	นางสาววาราลี ตาลอุทัย รหัสนักศึกษา 62050647
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.ภัทรินดา จารีย์ (สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล)

บทคัดย่อ

โรคตัวแดงดวงขาว เป็นหนึ่งในโรคที่สร้างความเสียหายต่ออุตสาหกรรมกุ้งไทย ส่งผลให้ผลผลิตกุ้งมีจำนวนลดน้อยลง เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก ที่ผ่านมาได้มีการหาแนวทางในการแก้ปัญหาการระบาดของโรคนี้ แต่ยังไม่สามารถแก้ไขได้ การศึกษาความรู้ใหม่ที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ่ม อาจทำให้ค้นพบแนวทางใหม่ ในการนำมาใช้แก้ปัญหาการระบาดของโรคได้ จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า กระบวนการกลืนกินตัวเองของเซลล์ หรืออพอโตฟาจี มีส่วนร่วมในการติดเชื้อไวรัส ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาบทบาทของยีน ATG14 ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอพอโตฟาจี ในกุ่มที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาว เริ่มจากการค้นหา และวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมของยีน ATG14 ของกุ่มขาว จากนั้นทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน ATG14 ในกุ่มพบว่ายีน ATG14 มีการแสดงออกมากที่สุดที่ลำไส้ อีกทั้งยังพบว่ายีน ATG14 มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นหลังจากกุ่มติดไวรัสตัวแดงดวงขาว ทำการศึกษาบทบาทของยีน ATG14 ในกุ่มที่ติดโรคตัวแดงดวงขาวด้วยเทคนิค RNA interference โดยได้ทำการสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับยีน ATG14 (dsATG14) พบว่าที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อกรัมกุ่มของ dsATG14 สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน ATG14 ในกุ่มได้ จากนั้นจึงทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน VP28 ในกุ่มที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน ATG14 หลังจากติดไวรัสตัวแดงดวงขาวพบว่าที่ 30 และ 48 ชั่วโมงหลังกุ่มติดไวรัส ยีน VP28 มีการแสดงออกลดลง และเมื่อตรวจสอบปริมาณของไวรัสตัวแดงดวงขาว พบว่าที่ 24 30 และ 48 ชั่วโมงหลังกุ่มติดไวรัส มีปริมาณไวรัสลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อีกทั้งยังติดตามอัตราการตายของกุ่มหลังติดไวรัส พบว่ากุ่มกลุ่มที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน ATG14 มีอัตราการตายช้ากว่ากลุ่มควบคุมในช่วง 1-4 วันหลังกุ่มติดไวรัส จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่ายีน ATG14 มีบทบาทที่เกี่ยวข้องในการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ่มขาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
คำสำคัญ : กระบวนการอพอโตฟาจี, ATG14, โรคตัวแดงดวงขาว, กุ่มขาว, อาร์เอ็นเอไอ

Title	The role of ATG14 in <i>Penaeus vannamei</i> upon WSSV infection
Students	Miss Waralee Tan-uthai Student ID 62050647
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
School	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2022
Advisor	Dr. Khanungkan Klanbut
Co-advisor	Dr. Phattarunda Jaree

Abstract

White spot disease is one of the diseases that damage the Thai shrimp industry, resulting in a decrease in shrimp products and huge economic loss. In the past, to solve this epidemic problem, a solution was investigated but not completed. New studies on the immune system in shrimp may lead to the discovery of a new approach to solving the outbreak. It had been reported that the cell self-eating process or autophagy is involved in viral infection. Therefore, this work aims to study the role of ATG14, a protein in the autophagy process during white spot syndrome virus (WSSV) infection. First, nucleotide sequences of ATG14 in *P. vannamei* were analyzed and its expression was investigated. The result found that ATG14 was highly expressed in an intestine and after WSSV infection it was increased. The role of ATG14 in WSSV infection was studied by using RNA Interference (RNAi). A double-stranded RNA specific to ATG14 (dsATG14) was generated. A concentration of 1 µg/g shrimp of dsATG14 could knock down ATG14 expression in shrimp and cause a reduction of VP28 mRNA at 30 and 48 hours post viral infection, correlating with downregulation of viral load at 24, 30 and 48 hours compared to the control group. The mortality rate of shrimp, after knocking down ATG14, was delayed when compared to the control group for 1-4 days after viral infection. These results can be concluded that the ATG14 plays a relevant role in WSSV infection in *P. vannamei*.

Keywords: Autophagy, ATG14, White spot syndrome virus, *Penaeus vannamei*, RNAi

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี เมื่อผู้ยืมได้เห็นว่าเอกสารฉบับนี้มีความ
ไม่ถูกต้องใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยการศึกษาบทบาทของยีน ATG14 ในกิ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว สำเร็จลุล่วงได้ดี เนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.ภัทรันดา จารีย์ รวมถึงบุคลากรของ ศูนย์วิจัยประยุกต์และพัฒนานวัตกรรมกิ้งในสถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้ สละเวลาอันมีค่าแก่คณะผู้วิจัย อีกทั้งยังกรุณาให้คำแนะนำปรึกษาตั้งแต่ขั้นตอนแรกของการวางแผน งานวิจัยไปจนสำเร็จแผนงานที่วางเอาไว้ สอนการใช้เครื่องมือและเทคนิคต่างๆ ที่จำเป็นต้องใช้ในการ ทำปฏิบัติการในครั้งนี้ อีกทั้งยังกรุณาให้คำแนะนำช่วยเหลือ ตรวจสอบแก้ไข และปรับปรุงงานวิจัยฉบับนี้ ให้ได้เป็นฉบับที่สมบูรณ์ คณะผู้วิจัยตระหนักถึงความตั้งใจจริงและทุ่มเทของอาจารย์ และบุคลากร ในทีม และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ อาจารย์ที่ปรึกษาที่สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า คุณทหารลาดกระบัง ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการเตรียมตัวไปฝึกปฏิบัติสหกิจศึกษา อีกทั้งยังให้ คำปรึกษาเกี่ยวกับหัวข้อวิจัยภายในเล่ม และได้กรุณาให้คำแนะนำช่วยเหลือด้วยความเอาใจใส่เป็น อย่างยิ่ง

อนึ่ง คณะผู้วิจัยหวังว่างานวิจัยฉบับนี้จะมีประโยชน์อยู่ไม่น้อย จึงขอมอบส่วนดีทั้งหมดนี้ ให้แก่เหล่าคณาจารย์รวมถึงบุคลากรของศูนย์วิจัยประยุกต์และพัฒนานวัตกรรมกิ้งในสถาบันชีววิทยา ศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล จนทำให้ผลงานวิจัยนี้เป็นประโยชน์ต่อผู้ที่เกี่ยวข้อง สำหรับ ข้อบกพร่องต่างๆ ที่อาจเกิดขึ้นนั้น คณะผู้วิจัยขอน้อมรับผิดเพียงผู้เดียว และยินดีที่จะรับฟังคำแนะนำ จากทุกท่านที่ได้เข้ามาศึกษา เพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนางานวิจัยของคุณผู้ทำวิจัยต่อไป

วราลี ตาลอุทัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง-ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ซ
คำย่อ/สัญลักษณ์.....	ณ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	2
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขต.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 กุ้งและระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง.....	3
2.1.1 ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (cellular immune response).....	3
2.1.2 ระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (humoral immune response).....	3
2.2 ไวรัสตัวแดงดวงขาว.....	4
2.3 กระบวนการอโตฟาจี.....	5
2.4 กระบวนการอโตฟาจีกับไวรัส.....	6
2.5 กระบวนการอโตฟาจีในกุ้ง.....	6-7
2.5.1 กระบวนการอโตฟาจีในกุ้ง <i>Macrobrachium nipponense</i>	6
2.5.2 กระบวนการอโตฟาจีในกุ้ง <i>Penaeus vannamei</i>	6
2.5.3 กระบวนการอโตฟาจีในกุ้ง <i>Procambarus clarkii</i>	7
2.6 ยีน ATG14.....	7
2.7 กระบวนการ RNAi (RNA interference).....	7-9
2.7.1 siRNA (small interfering RNA).....	8
2.7.2 miRNA (micro RNA).....	9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	10
3.1 การวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมของยีน ATG14.....	10-11
3.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน ATG14 ในเนื้อเยื่อกุ้งปกติ	11
3.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน ATG14 ในกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว	12
3.3.1 การเตรียมบ่อสำหรับเลี้ยงตัวอย่างกุ้งและการเก็บตัวอย่างกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว.....	12
3.3.2 การสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างกุ้ง.....	12-13
3.3.3 การสร้าง first – stranded cDNA	13
3.3.4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน ATG14.....	13
3.4 การสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับยีน ATG14.....	14
3.4.1 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (PCR amplification).....	15
3.4.2 เทคนิค agarose gel electrophoresis และ การวัดความเข้มข้นด้วย nanodrop spectrophotometer.....	15-16
3.4.3 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ (PCR purification).....	16
3.4.4 การ ligation.....	17
3.4.5 การ Transformation.....	17-18
3.4.6 ทำการคัดเลือก positive control ด้วยเทคนิค colony PCR.....	18-19
3.4.7 การสกัดพลาสมิด (Plasmid extraction).....	19-20
3.4.8 ทำการคัดเลือก positive clone ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	20
3.4.9 การเพิ่มจำนวน DNA แม่แบบ สำหรับการนำไปผลิต dsRNA.....	20-21
3.4.10 การสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ ที่จำเพาะกับยีน ATG14 (dsATG14).....	21-22
3.5 การตรวจสอบประสิทธิภาพของ dsATG14.....	22
3.6 การศึกษาบทบาทของยีน ATG14 ในกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว	23
3.6.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน ATG14 และยีนไวรัส VP28 ในกุ้ง.....	23
3.6.2 การบันทึกอัตราการตายของกุ้ง	23
3.6.3 ตรวจสอบปริมาณไวรัส (WSSV copy number) ของไวรัสตัวแดงดวงขาว ..	23
3.6.3.1 สกัด genomic DNA (gDNA).....	23-24
3.6.4.2 quantitative PCR.....	24
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	26
4.1 การวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมของยีน ATG14.....	26
4.1.1 การค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์.....	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ 4.1.2 การทำนาย conserved domain ให้นำนั้น ไม่อนุญาตให้วางไปใช้ประโยชน์ได้จนกว่า 27 คำ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 การสร้าง phylogenetic tree.....	27-28
4.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน ATG14 ในเนื้อเยื่อถุงปกติ.....	28-29
4.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน ATG14 ในกึ่งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว.....	29-30
4.4 การสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับยีน ATG14.....	30
4.4.1 การเพิ่มจำนวนยีน ATG14 ด้วยเทคนิค PCR (PCR amplification).....	30
4.4.2 การทำชั้นยีน ATG14 ให้บริสุทธิ์ (purification of PCR product).....	31
4.4.3 การทดลอง Transformation (Blue-white screening).....	31
4.4.4 การคัดเลือกโคโลนีด้วยเทคนิค colony PCR.....	32
4.4.5 การเลือกโคลนโดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	32-33
4.4.7 การทำชั้นยีน ATG14 ที่มีส่วนของ T7 promotor ให้บริสุทธิ์.....	34-35
4.4.8 การสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับยีน ATG14 (dsATG14).....	35-36
4.5 การตรวจสอบประสิทธิภาพของ dsATG14.....	36-37
4.6 การศึกษาบทบาทของยีน ATG14 ในกึ่งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว.....	37
4.6.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน ATG14 และยีนไวรัส VP28.....	37-39
4.6.2 การติดตามอัตราการตายของกึ่ง.....	40
4.6.3 การตรวจสอบปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV copy number).....	41
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	42
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	42
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	43
เอกสารอ้างอิง.....	44-47
ภาคผนวก.....	48
ภาคผนวก ก.....	49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 3.1 แสดงส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา qPCR (PCR reaction).....	11
ตารางที่ 3.2 แสดงอุณหภูมิและระยะเวลาในการทำ qPCR แต่ละขั้นตอน (PCR Condition)....	11
ตารางที่ 3.3 แสดงส่วนประกอบจากชุด RevertAid First Strand cDNA synthesis ของสารที่ใช้ในการสร้าง cDNA	13
ตารางที่ 3.4 แสดงส่วนประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR	15
ตารางที่ 3.5 แสดงขั้นตอนการทำ PCR (PCR amplification).....	15
ตารางที่ 3.6 แสดงส่วนประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการทำ ligation	17
ตารางที่ 3.7 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ LB.....	18
ตารางที่ 3.8 แสดงส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (selective media) สำหรับการคัดเลือกแบบ blue-white screening.....	18
ตารางที่ 3.9 แสดงส่วนประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR	19
ตารางที่ 3.10 แสดงขั้นตอนการทำ PCR (PCR amplification)	19
ตารางที่ 3.11 แสดงส่วนประกอบของสารที่ใช้ในการ cut check ด้วย <i>EcoRI</i>	20
ตารางที่ 3.12 แสดงส่วนประกอบของสารเคมี ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR..	21
ตารางที่ 3.13 แสดงขั้นตอนการทำ PCR (PCR amplification)	21
ตารางที่ 3.14 แสดงส่วนประกอบของสารที่ใช้ในการสร้าง dsRNA ด้วยชุด T7 Ribomax™	22
ตารางที่ 3.15 แสดงส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา qPCR (PCR reaction)	25
ตารางที่ 3.16 แสดงส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา qPCR (PCR reaction)	25
ตารางที่ 4.1 ผลการวัดความเข้มข้น purified PCR product ด้วย nanodrop spectrophotometer	31
ตารางที่ 4.2 ผลการวัดความเข้มข้นของพลาสมิดด้วย nanodrop spectrophotometer	33
ตารางที่ 4.3 ผลการวัดความเข้มข้น purified PCR product ของชิ้นยีน ATG14 ที่ต่อด้วย T7 promotor ด้วย nanodrop spectrophotometer	35
ตารางที่ 4.4 แสดงผลการวัดความเข้มข้น dsATG14 ด้วย nanodrop spectrophotometer .	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
ภาพที่ 2.1	ภาพเปรียบเทียบระหว่างกึ่งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาวและกึ่งปกติ	4
ภาพที่ 2.2	แสดงกระบวนการของออโตฟาจี และกลไกการควบคุม	5
ภาพที่ 2.3	แสดงกลไกของกระบวนการ RNAi ในเซลล์มนุษย์	8
ภาพที่ 3.1	pGEM®-T Easy Vector (Promega).....	17
ภาพที่ 4.1	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ ATG14 กึ่งขาว <i>Penaeus vannamei</i>	26
ภาพที่ 4.2	แสดงข้อมูลเกี่ยวกับ conserved domain โปรตีน ATG14	27
ภาพที่ 4.3	แสดงแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของโปรตีน ATG14.....	28
ภาพที่ 4.4	แสดงผลการแสดงออกของยีน ATG14 ในเนื้อเยื่อปกติ.....	29
ภาพที่ 4.5	การแสดงออกของยีน ATG14 หลังติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว	30
ภาพที่ 4.6	แสดงผลการตรวจสอบคุณภาพของ PCR product ของยีน ATG14	30
ภาพที่ 4.7	แสดงผลการตรวจสอบคุณภาพของ purified PCR product.....	31
ภาพที่ 4.8	แสดงผลการคัดเลือกโคโลนี ด้วยเทคนิค Blue-white screening	31
ภาพที่ 4.9	แสดงผลการคัดเลือกโคโลนีจากการทำ colony PCR.....	32
ภาพที่ 4.10	แสดงผลการตรวจสอบการคัดเลือกโคโลนีด้วยการใช้ <i>EcoRI</i>	33
ภาพที่ 4.11	ผลการตรวจสอบ PCR product ของยีน ATG14 ที่มีส่วนร่วมของ T7 promotor	34
ภาพที่ 4.12	แสดงผลการตรวจสอบชิ้นยีน purified PCR product	35
ภาพที่ 4.13	แสดงผลการตรวจสอบ dsATG14.....	36
ภาพที่ 4.14	แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน ATG14 เมื่อถูกยับยั้งการแสดงออก.. ..	37
ภาพที่ 4.15	แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน ATG14 ในเหงือกกึ่งที่ติดโรคตัวแดงดวง ขาว.....	38
ภาพที่ 4.16	แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน VP28 ในเหงือกกึ่งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว	38
ภาพที่ 4.17	แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน ATG14 ในเลือดกึ่งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว	39
ภาพที่ 4.18	แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน ATG14 ในเลือดกึ่งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว	39
ภาพที่ 4.19	แสดงอัตราการอยู่ตายของกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเมื่อถูกยับยั้งการแสดงออก ของยีน ATG14 ด้วย dsATG14 เทียบกับกึ่งกลุ่มควบคุม.....	40
ภาพที่ 4.20	แสดงผลการตรวจสอบปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาว ในกึ่งหลังติดโรคตัวแดงดวงขาว ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งหากนำไปใช้	41

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
WSSV	White Spot Syndrome Virus
Amp	Ampicillin
IPTG	isopropyl-B-D thiogalactopyranoside
DEPC	Diethylpyrocarbonate
UP H ₂ O	Ultra-pure H ₂ O
dsRNA	Double-stranded RNA
PCR	Polymerase chain reaction
DNA	Deoxyribonucleotide acid
RNA	Ribonucleotide
ATG	Autophagy-related gene

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กุ้งทะเลเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจหลัก ที่สร้างรายได้จากการส่งออกให้กับประเทศไทย เนื่องจากเป็นสัตว์น้ำที่ได้รับความนิยมบริโภคทั้งในประเทศ และต่างประเทศทั่วโลก ในปัจจุบันได้ประสบปัญหาผลผลิตกุ้งลดลงจากหลาย ๆ ปีก่อนหน้า สาเหตุส่วนหนึ่งเกิดจากการระบาดของโรคกุ้ง มีทั้งโรคที่เกิดขึ้นใหม่และโรคที่ยังมีการระบาดซ้ำอยู่ ซึ่งเป็นปัญหาที่ยังไม่สามารถแก้ไขได้ โดยหนึ่งในโรคที่ยังพบการระบาดซ้ำอยู่ในปัจจุบันนี้ คือโรคตัวแดงดวงขาว

โรคตัวแดงดวงขาว เป็นหนึ่งในโรคที่สร้างความเสียหายมากเป็นอันดับหนึ่งต่ออุตสาหกรรมกุ้ง พบได้ในกุ้งทะเลทุกชนิด เกิดจากเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus; WSSV) เป็นโรคระบาดที่อยู่ในบัญชีโรคสัตว์น้ำขององค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ และอยู่ในกฎกระทรวง พ.ศ. 2548 ภายใต้พระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2499 โดยการระบาดของโรคตัวแดงดวงขาว เป็นปัญหาหลักของเกษตรกรในแทบทุกประเทศ ไม่เว้นแม้แต่ในประเทศไทย ที่ยังประสบปัญหาการระบาดจนถึงปัจจุบัน ที่ผ่านมามีการวิจัยเกี่ยวกับกลไกการก่อโรคของไวรัสตัวแดงดวงขาว และยังมีแนวทางการป้องกันมากมาย แต่ยังไม่สามารถป้องกันและควบคุมโรคตัวแดงดวงขาวได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษาค้นคว้าความรู้ใหม่ซึ่งก็คือ กระบวนการออโตฟาจีในกุ้งออโตฟาจี หรือการกินตัวเองของเซลล์ เป็นกระบวนการที่เซลล์ใช้กำจัดองค์เซลล์ที่เสื่อมสภาพ เพื่อป้องกันการดำเนินงานที่ผิดปกติของเซลล์ซึ่งจะก่อให้เกิดโรค หากกระบวนการนี้ทำงานบกพร่องการทำงานระดับเซลล์อาจเกิดความผิดปกติ มีการสะสมของเสียและเสื่อมสภาพภายในเซลล์ ซึ่งอาจก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ (Glick et al.,2010) และออโตฟาจียังถือเป็นบทบาทสำคัญในการป้องกันภูมิคุ้มกันของเซลล์เมื่อติดไวรัส จากผลการศึกษากระบวนการออโตฟาจีในมนุษย์ พบว่ายีน ATG14 หรือที่เรียกว่า Atg14L หรือ Barkor มีบทบาทสำคัญในการสร้างออโตฟาโกโซมและเกิด nucleation มีความสำคัญสำหรับการกระตุ้นเริ่มแรกของการสร้างออโตฟาโกโซม ก่อตัวเป็น PtdIns3K (คลาส III Phosphatidylinositol 3-phosphate kinase complex) (Sun et al.,2008) ในการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจ ยีน ATG14 ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการทางชีวภาพที่หลากหลาย รวมถึงภูมิคุ้มกัน ยังมีข้อมูลเกี่ยวกับออโตฟาจีในสัตว์จำพวกครัสเตเชียน โดยเฉพาะกุ้งน้อยมาก (Zhu et al.,2022) ดังนั้นการศึกษายีนของยีน ATG14 ในกุ้งขาวที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาว อาจทำให้ได้องค์ความรู้ใหม่ที่สำคัญ ที่สามารถนำมาพัฒนาและประยุกต์ใช้ เพื่อแก้ไขปัญหาการระบาดของโรคตัวแดงดวงขาวในอุตสาหกรรมกุ้งได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาบทบาทของยีน ATG14 ในกิ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. ค้นหา และวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมของ ATG14 ในกิ้งขาว
2. ศึกษาการแสดงออกของยีน ATG14 ในกิ้ง
3. ศึกษาบทบาทของ ATG14 ในกิ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาวด้วยเทคนิค RNA interference

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ทราบถึงบทบาทของยีน ATG14 ในกิ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว ซึ่งองค์ความรู้นี้สามารถนำไปพัฒนาและประยุกต์ใช้ในการแก้ไขปัญหาการระบาดของโรคตัวแดงดวงขาวในอุตสาหกรรมกิ้งต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กุ้งและระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง

กุ้งมีกลไกการป้องกันตนเองจากสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรค โดยมีเม็ดเลือดเป็นศูนย์กลางในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่สำคัญ ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลไก คือ

1. กลไกการป้องกันตนเองโดยโครงสร้างภายนอกของร่างกาย (external defence mechanism) กุ้งมีโครงสร้างภายนอก (exoskeleton structure) ซึ่งเป็นสารพวกไคตินและไคโตซาน โดยบริเวณเปลือกจะมีเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างสารเมือก (mucopolysaccharide หรือ mucous) และหลังสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส (protease inhibitor) ที่สร้างจากเชื้อก่อโรคได้ นอกจากนี้ในขณะที่กุ้งลอกคราบ (molting) เพื่อการเจริญเติบโต และสามารถกำจัดพวกปรสิต บริเวณลำตัวออกไปพร้อมกับเปลือกแข็งได้ด้วย

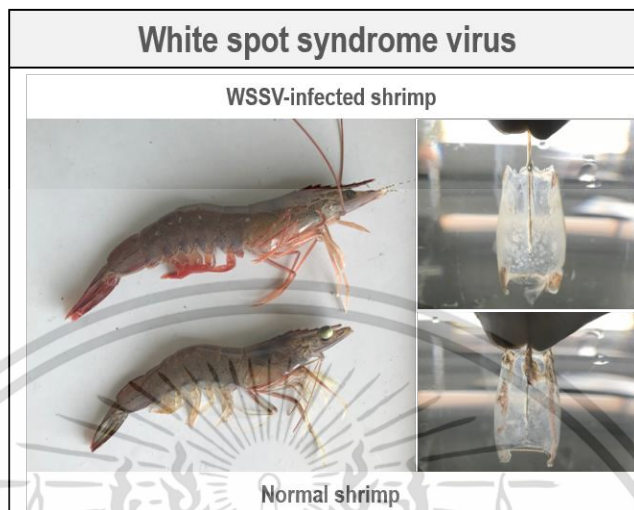
2. กลไกการป้องกันตนเองภายในร่างกาย (internal defence mechanism) เมื่อสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคเข้าสู่ร่างกายกุ้ง จะมีการตอบสนองภายในร่างกาย 2 ระบบ คือ

2.1 ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (cellular immune response) เช่น กระบวนการฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) การผลิตซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion production) กระบวนการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดใหญ่ (encapsulation) เป็นต้น (Soderhall and Cerenius, 1992) อาศัยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือด ในการทำลายสิ่งแปลกปลอม หรือเชื้อก่อโรคที่เข้าสู่ร่างกาย เซลล์เม็ดเลือดที่มีบทบาทสำคัญ คือ hyaline cell, semi-granular cell และ large granular cell ซึ่งจะกระจายอยู่ทั่วไป ตามเนื้อเยื่อภายในกระแสเลือด ต่อม้ำเหลือง กล้ามเนื้อหัวใจ ตับและตับอ่อน และอวัยวะอื่นๆ (ทัศนีย์, 2012)

2.2 ระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (humoral immune response) เช่น แอคคลูตินิน (agglutinin) การผลิตสารต้านจุลชีพ (antimicrobial peptide) โมดูเลเตอร์ (modulators) เป็นต้น (Soderhall and Cerenius, 1992) มีการทำงานต่อหรือทำงานร่วมกับระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ โดยเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งจะมีการผลิตสารโปรตีนทำหน้าที่ช่วยในการจดจำ และเข้าจับกันได้กับโมเลกุลของสิ่งแปลกปลอม หรือเชื้อก่อโรคซึ่งมีชื่อเรียกว่า pattern recognition protein (PRPs) ทำการส่งต่อสัญญาณผ่าน signaling pathway เพื่อกระตุ้นการทำงานในการกำจัดสิ่งแปลกปลอม (Tassanakajon et al., 2017)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ไวรัสตัวแดงดวงขาว



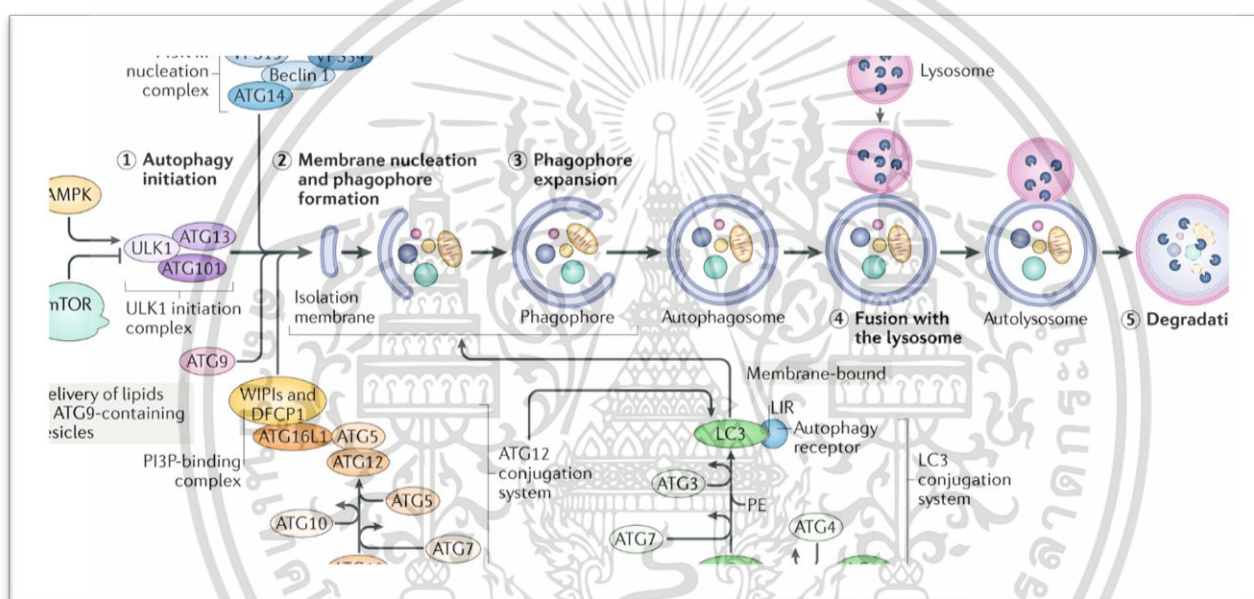
ภาพที่ 2.1 ภาพเปรียบเทียบระหว่างกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาวและกุ้งปกติ

โรคตัวแดงดวงขาว (White Spot Syndrome; WSD) เป็นหนึ่งในโรคที่สร้างความเสียหายมากเป็นอันดับหนึ่งต่ออุตสาหกรรมกุ้ง สามารถพบได้ในกุ้งทะเลทุกชนิด ซึ่งเป็นปัญหาหลักสำหรับเกษตรกรในแทบทุกประเทศไม่เว้นแม้แต่ในประเทศไทย โดยประเทศไทยพบการระบาดอย่างรุนแรงในพื้นที่การเลี้ยงกุ้งทะเลแถบภาคตะวันออก และภาคใต้ เช่นจันทบุรี ตราด นครศรีธรรมราช ปัตตานี และตรัง เป็นต้น โรคตัวแดงดวงขาวเกิดจากเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (White Spot Syndrome Virus; WSSV) จัดอยู่ใน Genus Whispovius และ Family Nimaviridae มีขนาด 130x350 นาโนเมตร มีเปลือกหุ้ม (envelope) รูปไข่ มีหางตรงส่วนปลาย มีนิวคลีโอแคปซิดรูปแท่ง เป็นไวรัสที่มีดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายพันธุกรรม ขนาดประมาณ 305 Kb ไวรัสนี้เพิ่มจำนวนภายในนิวเคลียสของเซลล์เจ้าบ้าน นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อไวรัส สามารถมีชีวิตอยู่ในธรรมชาติ โดยไม่ต้องอาศัยเจ้าบ้าน (host) ได้อย่างน้อย 30 วัน และอยู่ในบ่อเลี้ยงกุ้งได้ 3 ถึง 4 วัน ซึ่งสามารถถูกทำลายได้ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 120 นาที หรือ ที่ 60 °C เป็นเวลา 1 นาที (Nunan and Lightner, 1997; Poulos et al., 2001) โดยพบว่ากุ้งที่ติดเชื้อจะแสดงอาการซึม กินอาหารลดลง ไม่ติดตัว เปลือกอ่อนนุ่ม ตัวมีสีแดงเรื่อถึงชมพู ปรากฏลักษณะจุดขาวมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.1 ถึง 2 มิลลิเมตร โดยเฉพาะบริเวณส่วนหัวด้านข้างลำตัวและส่วนหาง (Chou et al., 1995) โรคนี้จัดเป็นโรคที่มีความรุนแรงสูงเนื่องจากการติดเชื้อทำให้มีโอกาสพบการตายสะสมได้ ถึง 100% ในระยะเวลาเพียง 2 ถึง 3 วัน (Lightner, 1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 กระบวนการอโตฟาจี

อโตฟาจีหรือกระบวนการกินตัวเองของเซลล์ เป็นกระบวนการปกติภายในเซลล์ต่าง ๆ ของร่างกาย เพื่อกำจัดโปรตีนหรือองค์ประกอบของเซลล์ที่เสื่อมสภาพ โดยองค์ประกอบดังกล่าวจะถูกบรรจุในถุงอโตฟาโกโซม หลังจากนั้นอโตฟาโกโซมจะรวมตัวกับไลโซโซม (Lysosome) ทำให้เกิดการย่อยสลายองค์ประกอบในอโตฟาโกโซมได้ (แสดงในภาพที่ 2.1) ในสภาวะปกติภายในเซลล์ mammalian target of rapamycin (mTOR pathway) มีหน้าที่ยับยั้งกระบวนการอโตฟาจี แต่เมื่อร่างกายอยู่ในสภาวะขาดอาหาร (Starvation) หรือภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) เซลล์จะกระตุ้น AMP-activated protein kinase (AMPK pathway) ซึ่งส่งผลยับยั้งการทำงานของ mTOR จึงส่งเสริมให้เกิดกระบวนการอโตฟาจี (Yu et al., 2018)



ภาพที่ 2.2 แสดงกระบวนการของอโตฟาจี และกลไกการควบคุม

ที่มา : <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0033-y>

กระบวนการอโตฟาจี (Autophagy : ATG) มีโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับอโตฟาจีจำนวนหนึ่ง ทำหน้าที่เป็นสื่อกลางและสามารถแบ่งได้เป็น 5 ขั้นตอน 1. Autophagy initiation: โดยเริ่มจากการเติมหมู่ฟอสเฟตเพื่อกระตุ้นการทำงานของกลุ่มโปรตีนเริ่มต้น (Pre-initiation complex) 2. Membrane nucleation and phagophore formation: สร้างเยื่อหุ้มสองชั้น (double-membrane nucleation) และเป็นขั้นตอนการสร้าง ออโตฟาโกโซม หรือ ฟาโกพอร์ (phagophore) 3. Phagophore expansion: เป็นขั้นตอนการขยายฟาโกพอร์ (phagophore) ให้มีขนาดยาวขึ้น มีการเหนี่ยวนำให้สารที่เสื่อมสภาพ และสิ่งแปลกปลอมที่ต้องถูกกำจัด เข้ามาอยู่ใกล้ฟาโกพอร์ 4. Fusion with the lysosome: เป็นขั้นตอนการเกิดการสร้างโครงสร้างอโตฟาโกโซม (autophagosome) โดยในขั้นตอนนี้จะมีการเหนี่ยวนำให้ไลโซโซม (Lysosome) รวมตัวกับอโตฟาโกโซม 5. Degradation: เกิดการย่อยสลายสารที่เสื่อมสภาพ และสิ่งแปลกปลอมในอโตฟาโกโซม (Hansen et al., 2018)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 กระบวนการออโตฟาจีกับไวรัส

ออโตฟาจีเป็นหนึ่งในระบบภูมิคุ้มกันที่มีความสามารถในการต้านไวรัส โดยการย่อยสลายโครงสร้างไวรัสภายในเซลล์ เพื่อลดจำนวนของไวรัส ซึ่งมีออโตฟาโกโซมทำหน้าที่ในการต้านไวรัส (Shi et al., 2008; Deretic, 2009) แต่ยังมีการศึกษาที่ขัดแย้งกับการทำหน้าที่ต้านไวรัสของออโตฟาจี เนื่องจากพบว่าออโตฟาจีสนับสนุนการติดเชื้อไวรัสบางชนิด (Kirkegaard, 2009) เช่น ไวรัส Poliovirus, coxsackievirus B3 virus, และ coronaviruses เป็นไวรัสที่ต้องการลักษณะบางอย่างของออโตฟาจีเพื่อเพิ่มจำนวน (Taylor and Kirkegaard, 2008; Wong et al., 2008; Reggiori et al., 2010) แม้จะยังไม่ทราบวิธีการที่ชัดเจน ต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัส แต่ยังมีอธิบายลักษณะในการสนับสนุนไวรัสของออโตฟาจี พบว่าเชื้อไวรัสกลุ่ม picornaviruses บางชนิดใช้เยื่อหุ้มของออโตฟาโกโซม เป็นส่วนช่วยในการสร้าง replication complex (Taylor and Kirkegaard, 2007; Taylor and Kirkegaard, 2008; Wong et al., 2008)

2.5 กระบวนการออโตฟาจีในกุ้ง

2.5.1 กระบวนการออโตฟาจีในกุ้ง *Macrobrachium nipponense*

จากผลงานวิจัยที่ผ่านมา ได้มีการศึกษากระบวนการออโตฟาจีในกุ้ง *M. nipponense* ที่ตอบสนองต่อสภาวะ hypoxia พบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการออโตฟาจี คือ Beclin-1 ATG7 และ ATG8 ถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในเนื้อเยื่อตับและตับอ่อน จากนั้นทำการตรวจสอบโครงสร้างเนื้อเยื่อของตับและตับอ่อนของกุ้งในสภาวะ hypoxia ตรวจพบว่ามี autophagic vacuole เพิ่มขึ้น อีกทั้งเมื่อทำการยับยั้งการแสดงออกของยีน ATG8 ในกุ้งที่อยู่ในสภาวะ hypoxia พบว่ากุ้งมีอัตราการตายเพิ่มมากขึ้น ซึ่งผลจากงานวิจัยนี้พบว่า ATG8 ซึ่งเป็นโปรตีนในกระบวนการออโตฟาจี สามารถนำมาพัฒนาเป็น biomarker ที่จะนำมาใช้ในการตรวจสอบกุ้งที่อยู่ในสภาวะ hypoxia ต่อไปได้ (Sun et al., 2019)

2.5.2 กระบวนการออโตฟาจีในกุ้ง *Penaeus vannamei*

ออโตฟาจีมีบทบาทสำคัญในภูมิคุ้มกันโดยธรรมชาติ และปรับตัวต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่บุกรุก เช่น ไวรัสและการลดลงของออโตฟาจีจะเพิ่มความไวต่อการติดเชื้อ (Deretic., 2010) จากผลงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการศึกษากระบวนการออโตฟาจีในกุ้ง *L. vannamei* โดยการใช้ rapamycin เป็นตัวยับยั้งการส่งสัญญาณ mammalian target of rapamycin (mTOR) ทางเดินอาหาร ซึ่งทั่วไปจะใช้เป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการออโตฟาจี (Blommaert et al., 1995) เมื่อใช้ rapamycin ในการยับยั้ง mTOR จะทำให้เกิดการกระตุ้นออโตฟาจี จึงทำการศึกษาโดยวิเคราะห์การถอดรหัสของเหงือกกุ้ง จากการแสดงออกของยีนในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ rapamycin บ่งชี้ว่าออโตฟาจีอาจส่งผลต่อภูมิคุ้มกันโดยธรรมชาติของกุ้ง (Wu et al., 2019)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.3 กระบวนการออโตฟาจีในกุ้ง *Procambarus clarkii*

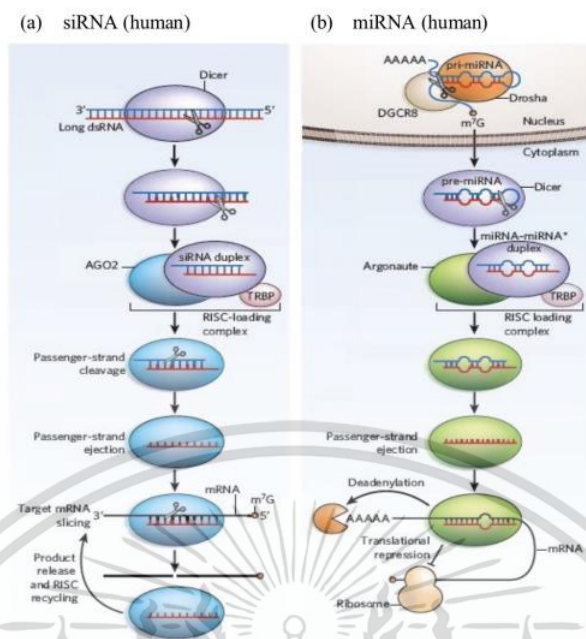
จากผลงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการศึกษาการแสดงออกของยีน ATG14 เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการออโตฟาจีในกุ้ง *P. clarkii* ที่ติดเชื้อ WSSV หลังจากการยับยั้งยีน ATG14 ด้วยเทคนิค RNAi สามารถลดอัตราการตาย โดยยับยั้งการจำลองแบบของไวรัสได้ สรุปได้ว่ายีน ATG14 ยับยั้งออโตฟาจี โดยลดการรวมตัวของ ออโตฟาโกโซม และ ไลโซโซม ดังนั้นจึงส่งเสริมการจำลองแบบ WSSV ใน *P. clarkii* (Zhu et al., 2022)

2.6 ยีน ATG14

ATG14 หรือที่เรียกว่า ATG14L หรือ Barkor มีบทบาทสำคัญในการสร้างออโตฟาโกโซม และการเกิด nucleation (Matsunaga et al., 2009; Itakura et al., 2008) มีโดยเกี่ยวข้องกับกระบวนการกระตุ้นของการสร้างออโตฟาโกโซมเริ่มจากการสร้าง PtdIns3K (คลาส III Phosphatidylinositol 3-phosphate kinase complex) (Sun et al., 2008) ในสภาวะที่เหมาะสม ATG14 ใน PtdIns3K-CI complex (Beclin-I-Vps34-Vps15-ATG14 complex) จะย้าย complex นี้จากไซโตพลาสซึมไปยังผนังกัน และออโตฟาโกโซม แต่เมื่อยับยั้งการแสดงออกของ ATG14 พบว่าการสร้าง PtdIns3K ลดลง และมีรายงานว่าการทำลาย ATG14 ในเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนของหนู ส่งผลให้เกิดการสร้างออโตฟาโกโซมที่บกพร่อง (Matsunaga et al., 2009) ใน ATG14 มีปลาย N-terminal โดเมนเพื่อบอกตำแหน่งใน endoplasmic reticulum (ER) และหากเกิดการกลายพันธุ์ของ cysteine เป็น alanine จะทำให้ complex สูญเสียตำแหน่งใน endoplasmic reticulum (ER) และยังนำไปสู่การสร้าง ออโตฟาโกโซมที่ผิดปกติ (Fan et al., 2011)

2.7 กระบวนการ RNAi (RNA interference)

RNAi เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นจากการทำงานของกรดนิวคลีอิกประเภท อาร์เอ็นเอขนาดเล็ก (small RNA) เช่น siRNA (small interfering RNA) miRNA (micro-RNA) หรือ shRNA (short hairpin RNA) ร่วมกับโปรตีนที่เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม RNase ชื่อว่า Dicer และโปรตีนกลุ่ม Argonaute กลไกของ RNAi ที่เกิดจากการทำงานของ siRNA และ miRNA ดังนี้



ภาพที่ 2.3 แสดงกลไกของกระบวนการ RNAi ในเซลล์มนุษย์ (a) siRNA และ (b) miRNA

ที่มา : <https://www.nature.com/articles/nature07755>

2.7.1 siRNA (small interfering RNA) เกิดจากการใส่อาร์เอ็นเอเส้นคู่ยาว (long dsRNA) ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นเข้าไปในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เมื่อเข้าไปอยู่ในไซโตพลาสซึม อาร์เอ็นเอเส้นคู่ยาวจะถูกตัดให้มีขนาดสั้นลงโดย RNA specific endonuclease (Dicer) เหลือความยาวประมาณ 21-25 คู่เบส (Bernstein et al., 2001) โดยที่ปลายด้าน 3' ทั้งสองข้างจะมีนิวคลีโอไทด์ยื่นเหลื่อมออกมา 2 นิวคลีโอไทด์ เรียกว่า small interfering RNA หรือ siRNA จากนั้น siRNA จะเข้าจับกับโปรตีนกลุ่ม Argonaute (ในมนุษย์เป็น AGO2) (Hammond et al., 2000) แล้วรวมเป็นโครงสร้างเชิงซ้อนเรียกว่า RNA-induced silencing complex (RISC) (Hutvagner and Simard, 2008) ซึ่งเอนไซม์ RNA helicase ที่อยู่ภายใน RISC จะใช้แยก siRNA จากเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยว โดยเส้นที่มีลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ที่เข้าคู่กับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายเรียกว่าเส้น Antisense หรือ Guide strand ส่วนเส้นที่เหลือเรียกว่าเส้น Sense หรือ Passenger strand ซึ่งจะถูกตัดทิ้ง ต่อมา Guide strand ที่อยู่ใน RISC จะพา RISC เข้าจับกับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย (Martines et al., 2002; Schwarz et al., 2002) อย่างจำเพาะเจาะจงตามหลักการเข้าคู่กันของคู่เบส จากนั้น Argonaute จะตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ ระหว่างนิวคลีโอไทด์ที่ 10 และ 11 บนเส้นเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย เมื่อนับจากปลาย 5' ของเส้น Guide strand (Elbashir et al., 2001; Elbashir et al., 2001) ทำให้เส้นเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายสลายตัวอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเมื่อตัดแล้วที่ปลายทั้ง 5' และ 3' ไม่มี Cap และ Poly A ตามลำดับ ช่วยในการป้องกันการสลายตัวอีกต่อไป (Liu et al., 2004) ดังนั้นจึงเป็นการยับยั้งการแสดงออกของยีน ณ ระดับหลังการถอดรหัส (post-transcription level) โดยการทำลายเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายก่อนที่จะถูกแปลรหัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.2 miRNA (micro RNA) จัดเป็นอาร์เอ็นเอขนาดเล็กชนิดหนึ่งที่มีชีวิตผลิตขึ้นมาได้เอง โดยเริ่มจากยีนที่มีหน้าที่ผลิต miRNA ถูกถอดรหัสให้ miRNA เริ่มต้น (pri-miRNA) โดยเป็นอาร์เอ็นเอสายคู่ที่มีรูปร่างผสมกันระหว่างก้านและบ่วง (stem-loop) ความยาวประมาณ 65-70 นิวคลีโอไทด์ จากนั้น pri-miRNA จะถูกเอนไซม์ในกลุ่ม RNase ชื่อว่า Drosha (Lee et al., 2003) ในนิวเคลียสตัดให้มีขนาดสั้นลงแล้วส่งไปไซโทพลาสซึม เรียกว่า Pre-miRNA เอนไซม์ Dicer จะตัด Pre-miRNA เหลือความยาวประมาณ 21-25 นิวคลีโอไทด์ เรียกว่า miRNA (ประกอบด้วยเส้น Guide strand และเส้น Passenger strand เช่นเดียวกัน) miRNA จะเข้าจับกับโปรตีน Argonaute เกิดเป็น RISC จะกำจัดเส้น Passenger strand ออกเหลือแต่เส้น Guide strand อยู่ใน RISC เท่านั้น จากนั้น Guide strand จะพา RISC ไปจับกับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย แต่เนื่องจากโดยโครงสร้างของ miRNA มีการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่เข้าคู่กับ RNA เป้าหมายได้ทั้งหมด (loop) ทำให้นิวคลีโอไทด์ระหว่าง miRNA และเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายจับกันเป็นบางส่วนเท่านั้น เชื่อว่าการจับกันเป็นบางส่วนนี้ทำให้เอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายไม่ถูกตัดโดยโปรตีน Argonaute แต่ miRNA จะไปกดการแสดงออกของยีนในระดับการแปลรหัส (translation repression) หรือการสังเคราะห์โปรตีน (Bartel, 2004; Pillai et al., 2007; Mathonnet et al., 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมของยีน ATG14

3.1.1 การสืบค้นข้อมูล

ค้นหาข้อมูลของยีน/โปรตีนที่ทำงานในกระบวนการออโตฟาจี ที่อาจจะมีส่วนสำคัญ หรือมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการติดไวรัสในสิ่งมีชีวิต โดยทำการสืบค้นวารสาร และผลงานตีพิมพ์ของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้ยีนที่สนใจนำมาศึกษาต่อ คือ ATG14

3.1.2 การหา Conserve domain

1. ค้นหาลำดับสารพันธุกรรมของ ATG14 ในกุ้งขาว *Penaeus vannamei* จากฐานข้อมูล NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
2. เลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) เฉพาะบริเวณ CDS (Coding Sequence) ไปทำการแปล รหัส (Translate) ให้ได้เป็นลำดับกรดอะมิโน (amino acid) ด้วยโปรแกรม Translate tool ใน Expasy (<https://web.expasy.org/translate/>)
3. นำลำดับกรดอะมิโนของ ATG14 มาทำนาย conserved domain ด้วยโปรแกรม SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>)

3.1.3 การสร้าง phylogenetic tree

1. ค้นหาลำดับกรดอะมิโนของ ATG14 ในสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ โดยเฉพาะสิ่งมีชีวิตที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับกุ้ง จากฐานข้อมูล NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
2. จากข้อมูลลำดับกรดอะมิโนอยู่ในรูปแบบ FASTA โดยใช้โปรแกรม TAB to FASTA (http://sequenceconversion.bugaco.com/converter/biology/sequences/tab_to_fasta.php)
3. นำลำดับกรดอะมิโนของ ATG14 จากแต่ละสิ่งมีชีวิตมาเปรียบเทียบ โดยเลือกคำสั่ง 'alignment' โดยการเปิด fasta file ผ่านโปรแกรม MEGA11 และบันทึกไฟล์เป็นรูปแบบ .MEGA
4. ทำการสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA11
 - เลือก 'Phylogeny → 'Construct/Test Neighbor – Joining Tree ...'
 - เปิดไฟล์ MEGA ที่ได้บันทึกไว้
 - ตรกรอบ phylogeny test ให้กำหนดค่า ดังนี้

Test of Phylogeny → Bootstrap method

no. of Bootstrap Replications → 1000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- กด 'OK' เพื่อให้โปรแกรมสร้าง phylogenetic tree

3.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน ATG14 ในเนื้อเยื่อต่างๆ

นำ cDNA ที่ได้จากเนื้อเยื่อต่างๆ ประกอบด้วย เหงือก (Gill) ลำไส้ (Intestine) ต่อม้ำเหลือง (Lymphoid organ) หัวใจ (Heart) กระเพาะ (Stomach) ตับและตับอ่อน (Hepatopancreas) และ เลือด (Hemocyte) มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน ATG14 ด้วยเทคนิค quantitative PCR (qPCR) เริ่มจากการเตรียมส่วนประกอบสำหรับการทำ qPCR ตามที่ระบุไว้ในตารางที่ 3.1 โดยใช้อุณหภูมิตามที่ระบุไว้ในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.1 แสดงส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา qPCR (PCR reaction)

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μl)
Luna qPCR mix enzyme (NEB)	5
10 μM forward primer	0.15
10 μM reverse primer	0.15
UP H ₂ O	3.7
Template cDNA	1
Total Volume (master mix = 9 μl)	10

ตารางที่ 3.2 แสดงอุณหภูมิและระยะเวลาในการทำ qPCR แต่ละขั้นตอน (PCR Condition)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	ทำซ้ำ
Initial Denaturation	95 °C	1 นาที	
Denaturation	95 °C	15 วินาที	40 รอบ
Annealing	60 °C	30 วินาที	
Melt curve	60 - 95 °C	7 นาที	

ในการทดลองนี้ ได้ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน ATG14 โดยทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน Elongation factor – 1 alpha (EF-1 α) ซึ่งเป็น Housekeeping gene ที่มีการแสดงออกคงที่ ใช้เป็น internal control และทำการวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีน ATG14 ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ตามสมการ (mathematic model) ของ Pfaffli ที่กำหนดค่า relative expression เท่ากับ $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Pfaffli., 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน ATG14 ในกึ่งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว

3.3.1 การเตรียมบ่อสำหรับเลี้ยงตัวอย่างกึ่ง และการเก็บตัวอย่างกึ่งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว

เตรียมบ่อสำหรับเลี้ยงกึ่ง และเติมน้ำที่มีค่าความเค็มที่ 10 ppt ปริมาตร $\frac{3}{4}$ ของบ่อทำการเตรียมสารละลายไวรัสสำหรับฉีดไวรัสเข้ากึ่ง เริ่มจากเจือจางความเข้มข้นของไวรัสตัวแดงดวงขาว 10^{-4} เท่า จากนั้นฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาว ที่เจือจางแล้วเข้ากึ่ง ตัวละ 50 μ l โดยใช้เข็มอินซูลิน จากนั้นจะทำการเก็บตัวอย่างทั้งเลือดและเหงือก หลังจากกึ่งติดไวรัสที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ในการเก็บตัวอย่างเลือดจะทำการเตรียมเข็มอินซูลิน ที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด 10% Trisodium citrate (anti-coagulant) ปริมาตร 100 μ l ทำการดูดเลือดกึ่งจากแอ่งเลือด จากนั้นนำเลือดที่ได้มาฉีดใส่หลอด 1.5-ml ที่มี Genezol 500 μ l และนำไป vortex ให้เข้ากัน ในส่วนของการเก็บตัวอย่างเหงือก เก็บชิ้นส่วนเหงือกของกึ่งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว มาใส่ในหลอด 1.5-ml ที่มี Genezol 200 μ l บดให้เป็นเนื้อเดียวกัน เติม Genezol 300 μ l และนำไป vortex ให้เข้ากัน เก็บตัวอย่างที่ได้ในตู้เย็น -80°C เพื่อนำไปสกัดอาร์เอ็นเอต่อไป (Xie et al., 2005)

3.3.2 การสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างกึ่ง

- นำตัวอย่างกึ่งที่อยู่ใน Genezol มาทำการสกัดอาร์เอ็นเอ เริ่มจากการเติม Chloroform 100 μ l จากนั้นทำการผสมให้เข้ากันโดยการ vortex เป็นเวลา 30 วินาที นำไปทำการปั่นเหวี่ยง (centrifugation) ที่ความเร็ว 12,500 xg ที่ อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที
- เมื่อทำการปั่นเหวี่ยงเสร็จแล้ว จะได้สารละลายเป็น 3 ส่วน คือส่วนของสารละลายใส (ชั้นบน) ตะกอนโปรตีน (ชั้นกลาง) และส่วนของสารละลายใสสีชมพู (ชั้นล่าง) ให้ทำการดูดสารส่วนใส มาใส่ หลอด 1.5-ml ใหม่ จากนั้นเติม isopropanol (ที่เย็น) 1 volume แล้วทำให้เข้ากันโดยการ พลิกหลอดกลับไปมาจำนวน 20 ครั้ง และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที
- จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,500 xg ที่ อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาทีจากนั้นเทส่วนใสทิ้ง และเหลือตะกอนสีขาวขุ่นที่ก้นหลอด
- เติม 70% Ethanol (ที่เย็น) 500 μ l แล้วทำให้สารละลายเข้ากันโดย พลิกหลอดกลับไปมาจำนวน 20 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ที่ความเร็ว 12,500 xg ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที
- เทส่วนใสทิ้ง จะเหลือตะกอน จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงอีกรอบที่ความเร็ว 12,500 xg อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที
- ดูดสารละลายที่เหลือออกจนหมดให้เหลือไว้เพียงตะกอนเท่านั้น แล้วเปิดฝาหลอดทดลองเอาไว้ เพื่อเป็นการตากตะกอน (air dry) รอจนตะกอนเปลี่ยนสี จากสีขาวขุ่นเป็นสีใส ประมาณ 10 นาที
- เติมน้ำ DEPC เพื่อละลายตะกอน โดยตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที โดยทุก ๆ 10 นาที จะทำให้เข้ากัน (mix) และ spin down

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. วัดค่าความเข้มข้นด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer เริ่มจากเปิดเครื่อง nanodrop ตั้งค่า blank โดยใช้ น้ำ DEPC ทำการปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1 μl กดปุ่มวัดความเข้มข้น และทำการบันทึก เมื่อวัดเสร็จแล้วให้ทำการล้างด้วยน้ำ DEPC อีกครั้งเพื่อทำความสะอาด
9. อาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างกุ้ง เมื่อวัดความเข้มข้นแล้ว จะนำมาปรับให้มี ความเข้มข้นเท่ากัน ถ้าเป็น ตัวอย่างจากเม็ดเลือดจากปรับให้มีความเข้มข้น 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$ และถ้าเป็นตัวอย่างจากเหงือก จะปรับให้มีความเข้มข้น 300 $\text{ng}/\mu\text{l}$ เพื่อนำไปใช้ในการสร้าง cDNA ต่อไป

3.3.3 การสร้าง first – stranded cDNA

1. นำตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาสร้างเป็น cDNA ด้วยชุด RevertAid reverse transcriptase (Thermo scientific) โดยทำการเตรียมสารประกอบ ตามที่ระบุไว้ในตารางที่ 3.3
2. จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง PCR เพื่อสร้าง cDNA ที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 90 นาที และอุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 15 นาที
3. ทำการจัดเก็บ cDNA ที่สร้างได้ที่ -20 °C

ตารางที่ 3.3 แสดงส่วนประกอบจากชุด RevertAid First Strand cDNA synthesis (Thermo scientific) ของสารที่ใช้ในการสร้าง cDNA

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μl)
5X reaction buffer	1
10 mM dNTP mix	0.5
Oligo dT primer	0.25
Ribolock RNase inhibitor	0.25
RevertAid- reverse transcriptase	0.25
RNA+DEPC H ₂ O	2.75
Total volume	5

3.3.4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน ATG14

นำ cDNA ที่สร้างได้มาทำให้เจือจาง 5 เท่า ด้วยน้ำ UP H₂O จากนั้นนำไปใช้เป็นแม่แบบ (DNA template) ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน ATG14 ในกุ้งที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยเทคนิค qPCR (ตามที่ระบุในหัวข้อ 3.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 การสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับยีน ATG14 (Jaree et al., 2022)

1. ทำการเพิ่มจำนวน (Amplification) DNA ของยีน ATG14 จาก cDNA ของกุ้งขาว ด้วยเทคนิค PCR (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.1)
2. นำ PCR product มาตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.2)
3. นำไปวัดค่าความเข้มข้นด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.2)
4. ทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.3) นำไปวัดค่าความเข้มข้นด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer และตรวจสอบการแสดงออกด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis อีกครั้ง (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.2)
5. ทำการเชื่อม (ligation) ชิ้นส่วนของยีนกับ vector pGEM-T easy (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.4)
6. ทำการ Transformation (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.5) และคัดเลือกด้วยเทคนิค blue-white screening
7. ทำการเลือกโคโลนี (colony) สีขาว มาตรวจสอบ positive clone ด้วยเทคนิค colony PCR (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.6) และตรวจสอบผลด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis
8. เมื่อได้ positive clone จะนำโคโลนีนั้นไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-amp ที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืนสำหรับการสกัดพลาสมิด (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.7)
9. นำพลาสมิดที่สกัดได้มาตรวจสอบ ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.8) แล้วทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis และนำพลาสมิดไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer
10. นำพลาสมิดที่ได้มาใช้เป็นแม่แบบ ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ที่มีการต่อส่วนของ T7 promotor สำหรับการนำไปผลิตอาร์เอ็นเอสายคู่หรือ dsRNA ด้วยเทคนิค PCR (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.9)
11. นำ PCR product ที่ได้ มาทำให้บริสุทธิ์ (PCR purification) (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.3)
12. ตรวจสอบ purified PCR product ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis และนำไป วัดความเข้มข้นด้วย nanodrop spectrophotometer (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.2)
13. ทำการสร้าง dsRNA ที่จำเพาะกับยีน ATG14 หรือ dsATG14 (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.10)

3.4.1 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (PCR amplification)

ตารางที่ 3.4 แสดงส่วนประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μ l)
UP H ₂ O	40.25
10x PCR buffer	5
10 μ M dNTPs mix	1
10 μ M Forward primer	0.75
10 μ M Reward primer	0.75
Taq DNA polymerase	0.25
cDNA ของกุ้งขาว	2
total Volume	50

ตารางที่ 3.5 แสดงขั้นตอนการทำ PCR (PCR amplification)

ปฏิกิริยา PCR	อุณหภูมิ	เวลา	ทำซ้ำ
Initial Denaturation	94 °C	2 นาที	
Denaturation	94 °C	30 วินาที	30 รอบ
Annealing	58 °C	30 วินาที	
Extension	72 °C	1 นาที	
Final extension	72 °C	5 นาที	

3.4.2 การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis และการวัดความเข้มข้นด้วย nanodrop spectrophotometer

1. เทคนิค agarose gel electrophoresis

- 1.1 เตรียม agarose gel ความเข้มข้น 1.2% เริ่มจากการชั่ง agarose gel 1.2 กรัม ใส่ในขวดหรือ flask
- 1.2 เติมน้ำบัฟเฟอร์ 1xTBE ปริมาตร 100 ml
- 1.3 ทำให้เจลละลายโดยการนำไปเข้าไมโครเวฟเป็นเวลา 1-2 นาที
- 1.4 เมื่อได้สารละลาย agarose gel ที่สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน วางพักไว้จนอุณหภูมิประมาณ 60 °C เติมน้ำย้อมดีเอ็นเอ (Red safe) 3 และ 5 μ l ตามปริมาตรเจล 15 และ 25 ml ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การวัดความเข้มข้นด้วย nanodrop spectrophotometer
 - 2.1 วัดค่าความเข้มข้นด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer
 - 2.2 เปิดเครื่อง nanodrop
 - 2.3 ตั้งค่า blank โดยใช้ น้ำ DEPC
 - 2.4 ทำการปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1 μ l กดปุ่มวัดความเข้มข้นและทำการบันทึก
 - 2.5 เมื่อวัดเสร็จแล้วให้ทำการล้างด้วยน้ำ DEPC อีกครั้งเพื่อทำความสะอาด

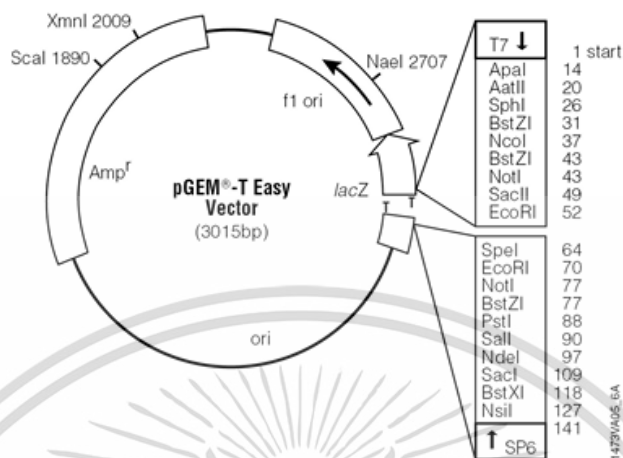
โดยจะทำการบันทึกอัตราส่วนการดูดกลืนแสง 260/280 ($A_{260/280}$) เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนในโปรตีน ถ้าค่าที่วัดได้มากกว่าหรือเท่ากับ 1.8 จะสามารถบอกได้ว่าตัวอย่าง DNA นั้นไม่มีโปรตีนปนเปื้อน และอัตราส่วนการดูดกลืนแสง 260/230 ($A_{260/230}$) นั้นค่าที่มากกว่า 1.8 จะสามารถบอกได้ว่าตัวอย่าง DNA ไม่มีการปนเปื้อนสารประกอบอินทรีย์ (inorganic solvent) เช่น สารละลายเอทานอล

3.4.3 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ (PCR purification) สามารถทำได้ 2 แบบ ใช้ชุด GenepHlow™ Gel/PCR (Geneaid)

1. ในขั้นตอนการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ สามารถทำได้ 2 แบบ แบบแรกคือการรัน PCR product ด้วย agarose gel จากนั้นตัดชิ้นส่วนเจลเฉพาะบริเวณที่ต้องการส่วนที่สองคือนำสารละลาย PCR product มาทำให้บริสุทธิ์เลย โดยแบบแรกเมื่อตัดชิ้นส่วนเจล และนำไปละลายเจลที่อุณหภูมิ 55 °C 15 นาที spin down รอละลายจนหมด ส่วนแบบที่สองสามารถเติม Gel/PCR buffer 5 volume ต่อ PCR product 1 volume และทำขั้นตอนต่อไปได้เลย
2. ประกอบ column และ collection tube จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่างใส่ column 800 μ l แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 xg 30 วินาที ทิ้งสารละลายใน collection tube
3. เติม W1 buffer 400 μ l แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 xg 30 วินาที ทิ้งสารละลายใน collection tube และเติม Wash buffer 600 μ l ตั้งทิ้งไว้อุณหภูมิห้อง 1 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 xg 30 วินาที ทิ้งสารละลายใน collection tube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 11,000 xg 3 นาที
4. ย้าย column ไปหลอดทดลอง 1.5-ml จากนั้นเติม UP H₂O (ที่ผ่านการอุ่นให้ร้อน) ปริมาตร 17 μ l ลงใน column ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 xg 2 นาที
5. นำ DNA ที่ได้มาผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (purified PCR product) ที่ได้มาวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer และทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.4 การ ligation



ภาพที่ 3.1 pGEM®-T Easy Vector (Promega)

ตารางที่ 3.6 แสดงส่วนประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการทำ ligation

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μl)
Nuclease-free water	4.8
10X Rapid Ligation buffer	1
pGEM-T easy vector (50ng/ μl)	0.5
PCR product	2.7
T4 DNA ligase	1
Total Volume	10

นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง (ข้ามคืน)

3.4.5 การ Transformation

1. นำ competent cell *E. coli* สายพันธุ์ DH- α 5 มาเติมสารละลาย ligation mixture 5 μ l ที่เตรียมไว้แล้ววางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
2. นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 1 นาที และนำไปแช่เย็นไว้บนน้ำแข็ง
3. เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 900 μ l แล้วนำไปเลี้ยงที่เครื่อง shaker อุณหภูมิ 37 °C 200 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (selective media) สำหรับการทำให้ blue-white screening โดยนำยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (Ampicillin) Amp, X-gal, IPTG มาทำการ spread ลงบนอาหาร LB agar (ตามที่ระบุไว้ในตารางที่ 3.8)
5. นำเชื้อที่บ่มไว้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 rpm 3 นาที เทอาหารออกบางส่วน นำอาหารที่เหลือมาละลายตะกอน แล้วทำการ spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ และนำไปบ่มที่ 37 °C ข้ามคืน

ตารางที่ 3.7 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ LB

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (g)
Yeast extract	0.5
Peptone	1
NaCl	1
H ₂ O	100 ml

ตารางที่ 3.8 แสดงส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (selective media) สำหรับการคัดเลือกแบบ blue-white screening

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (μl)
100 mg/ml Ampicillin	20
20 mg/ml X-gal	40
100mM IPTG	10
Sterile H ₂ O	100

3.4.6 ทำการคัดเลือก positive control ด้วยเทคนิค colony PCR

1. เตรียม 8-strip PCR tube ใส่ น้ำ UP H₂O (sterile) หลอดละ 5 μl ทำการเลือกโคโลนีสีขาว 8 โคโลนีมาละลายใน 8-strip PCR tube โดยจะนำสารละลาย 1 μl มาเป็นแม่แบบในการทำ colony PCR
2. Colony PCR amplification
3. ตรวจสอบ PCR product ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis (ตามที่ระบุไว้ในหัวข้อที่ 3.4.2)
4. เลือก positive colony มา 3 โคโลนี นำไปเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Amp จากนั้นนำไปเลี้ยงที่ shaker อุณหภูมิ 37 °C 200 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.9 แสดงส่วนประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (µl)
UP H ₂ O	20.15
10x PCR buffer	2.5
10mM dNTP mix	0.5
10 µM forward primer	0.375
10 µM reward primer	0.375
<i>Taq</i> DNA polymerase	0.125
DNA template	1
total volume	25

ตารางที่ 3.10 แสดงขั้นตอนการทำ PCR (PCR amplification)

ปฏิกิริยา PCR	อุณหภูมิ	เวลา	ทำซ้ำ
Initial Denaturation	94 °C	2 นาที	30 รอบ
Denaturation	94 °C	30 วินาที	
Annealing	58 °C	30 วินาที	
Extension	72 °C	1 นาที	
Final extension	72 °C	5 นาที	

3.4.7 การสกัดพลาสมิด (Plasmid extraction) โดย Presto™ Mini Plasmid Kit (Geneaid)

- นำหลอดที่เลี้ยงเชื้อไว้ ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,500 xg เป็นเวลา 5 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อออก และละลายตะกอนด้วย PD1 buffer ปริมาตร 200 µl
- ปิเปตสารละลายทั้งหมดใส่หลอดขนาด 1.5-ml ใส่ PD2 buffer ปริมาตร 200 µl ทำให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมา (invert) 10 ครั้ง และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที
- ใส่ PD3 buffer ปริมาตร 300 µl ทำให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมา (invert) 10 ครั้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 xg เป็นเวลา 10 นาที
- เตรียม PDH column ขนาด 2 ml จากนั้นปิเปตส่วนใส่ทั้งหมดประมาณ 700 µl ลงใน PDH column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 xg เป็นเวลา 30 วินาที และทิ้งสารละลายที่อยู่ใน collection tube ทิ้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ปิเปต W1 400 μl ลง column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 xg เป็นเวลา 30 วินาทีและทิ้งสารละลายที่อยู่ใน collection tube ทิ้ง
6. ปิเปต Wash buffer 600 μl ลงใน column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 xg เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งสารละลายที่อยู่ใน collection tube ทิ้งและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 xg ต่ออีก 3 นาที จากนั้นนำ column ใส่หลอด 1.5-ml ใหม่
7. ใส่ Elution buffer 35 μl ทิ้งไว้ 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 xg เป็นเวลา 2 นาที
8. นำสารละลายพลาสมิดไปวัดความเข้มข้น ด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer (ตามที่ระบุไว้ในหัวข้อที่ 3.4.2)

3.4.8 ทำการคัดเลือก positive clone ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

1. นำพลาสมิดที่สกัดได้มา cut check ด้วย restriction enzyme *EcoRI* ตามที่ระบุไว้ในตารางที่ 3.11 บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
2. ทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis (ตามที่ระบุไว้ในหัวข้อที่ 3.4.2)

ตารางที่ 3.11 แสดงส่วนประกอบของสารที่ใช้ในการ cut check ด้วย restriction enzyme *EcoRI*

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μl)
H ₂ O	3.5
10X buffer	1
Plasmid	5
Enzyme	0.5
Total volume	10

3.4.9 การเพิ่มจำนวน DNA แม่แบบ สำหรับการนำไปผลิต dsRNA

1. นำพลาสมิดที่สกัดได้ มาเป็น DNA template ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับการสร้าง dsRNA โดยการนำไปเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR ตามที่ระบุไว้ในตารางที่ 3.12
2. ตรวจสอบ PCR product ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis (ตามที่ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.2)
3. นำ PCR product มา PCR purification ด้วย GeneHlow™ Gel/PCR Kit (Geneaid) (ตามที่ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.3)
4. วัดความเข้มข้นของ purified PCR product ด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer และตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis (ตามที่ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.12 แสดงส่วนประกอบของสารเคมี ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (µl)
UP H ₂ O	41.25
10X PCR buffer	5
10 mM dNTPs mix	1
10 µM forward primer	0.75
10 µM reverse primer	0.75
Taq DNA polymerase	0.25
DNA template	1
Total volume	50

ตารางที่ 3.13 แสดงขั้นตอนการทำ PCR (PCR amplification)

ปฏิกิริยา PCR	อุณหภูมิ	เวลา	ทำซ้ำ
Initial Denaturation	94 °C	2 นาที	30 รอบ
Denaturation	94 °C	30 วินาที	
Annealing	58 °C	30 วินาที	
Extension	72 °C	1 นาที	
Final extension	72 °C	5 นาที	

3.4.10 การสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ ที่จำเพาะกับยีน ATG14 (dsATG14)

1. ทำการสร้าง dsATG14 ด้วยชุด T7 Ribomax™ Express Large Scale RNA production system (Promega) ตามที่ระบุไว้ในตารางที่ 3.13 โดยป้อนที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
2. เติม RQ1 RNase-free DNase 1 µl และนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 15 นาที
3. นำสารละลาย RNA หลอด sense และ anti-sense มารวมกันแล้วนำไป heat ที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็น 30 นาที
4. นำสารละลายดังกล่าวใส่ในหลอด 1.5-ml ใหม่ ใส่ 3M sodium acetate, pH 5.2 ปริมาตร 1/10 Volume และใส่ isopropanol ที่เย็น 1 Volume ผสมให้เข้ากัน (mix) และ spin down

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,500 xg เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C แล้วเติม 70% Ethanol ที่เย็น 500 μ l นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,500 xg เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เทสารละลายทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,500 xg เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C
6. ใช้ปิเปตดูดสารละลายที่เหลือออกให้หมด และเปิดฝาทากตะกอน รอจนตะกอนเปลี่ยนสี จากสีขาวขุ่นไปเป็นสีใสใช้เวลาประมาณ 15-20 นาที
7. เติมน้ำ DEPC เพื่อละลายตะกอน
8. วัดความเข้มข้น dsATG14 ด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer และตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis (ตามที่ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.2)

ตารางที่ 3.14 แสดงส่วนประกอบของสารที่ใช้ในการสร้าง dsRNA ด้วยชุด T7 Ribomax™ Express Large Scale RNA production system (Promega)

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μ l)
RiboMAX™ Express T7 2X Buffer	10
linear DNA template (1 μ g)	1-8
Nuclease-Free Water	0-7
Enzyme Mix, T7 Express	2
Total volume	20

3.5 การตรวจสอบประสิทธิภาพของ dsATG14 ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน ATG14 ในกิ้ง

ในการทดลองนี้จะแบ่งกิ้งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ 1) กิ้งที่ฉีดด้วย dsGFP เป็นกลุ่มควบคุมเนื่องจากยีน GFP (green fluorescence protein) ไม่สามารถพบได้ในกิ้ง เมื่อฉีดเข้ากิ้ง dsGFP ไม่สามารถจำเพาะกับยีนในกิ้งได้ และ 2) กิ้งที่ฉีดด้วย dsATG14 เป็นกลุ่มทดลอง โดยจะทำการตรวจหาความเข้มข้นของ dsRNA ที่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน ATG14 ในกิ้งได้ ซึ่งจะใช้ 2 ความเข้มข้นคือ 1 และ 2.5 μ g ต่อกรัมกิ้ง ในการทดลองนี้จะใช้กิ้งขาวสุขภาพดี ขนาด 2-3 กรัม เริ่มจากการฉีดสารละลาย dsRNA หลังจากฉีด dsRNA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะทำการเก็บตัวอย่างเหวี่ยง นำไปสกัดอาร์เอ็นเอ (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.3.2) จากนั้นวัดความเข้มข้นด้วย nanodrop spectrophotometer และนำไปสร้าง first-strand cDNA (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.3.3) ทำการตรวจสอบประสิทธิภาพของ dsATG14 ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน ATG14 ด้วยเทคนิค qPCR (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 การศึกษาบทบาทของยีน ATG14 ในกึ่งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว

3.6.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน ATG14 และยีนไวรัส VP28 ในกึ่ง

ในการทดลองนี้ได้แบ่งกึ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรก กึ่งที่ถูกฉีดด้วย dsGFP และกลุ่มที่สอง คือกึ่งที่ถูกฉีดด้วย dsATG14 โดยจะฉีด dsRNA ที่ความเข้มข้น 1 μg ต่อกรัมกึ่ง หลังจากฉีด dsRNA 24 ชั่วโมง จะฉีดสารละลายไวรัสตัวแดงดวงขาว ทำการเก็บตัวอย่างกึ่ง (เหงือกและเลือด) หลังติดไวรัสที่เวลา 24 30 และ 48 ชั่วโมงนำไปสกัดอาร์เอ็นเอ (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.3.2) จากนั้นวัดความเข้มข้นด้วย nanodrop spectrophotometer และนำไปสร้าง first-strand cDNA (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.3.3) ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน ATG14 และยีนไวรัส VP28 ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน ATG14 ด้วยเทคนิค qPCR (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.2)

3.6.2 การบันทึกอัตราการตายของกึ่ง

ทำการบันทึกอัตราการตายของกึ่งกลุ่มตัวอย่างตามที่ระบุไว้ในหัวข้อที่ 3.6.1 หลังจากฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาวทุก ๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 8 วัน จากนั้นนำมาวิเคราะห์ผลการทดลอง

3.6.3 ตรวจสอบปริมาณไวรัส (WSSV copy number) ของไวรัสตัวแดงดวงขาว

ทำการตรวจสอบปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV copy number) ในกลุ่มตัวอย่างที่ระบุในข้อ 3.6.1 โดยเริ่มจากการเก็บเหงือกมาสกัด genomic DNA (ตามที่ระบุไว้ในหัวข้อ 3.6.3.1) จากนั้นทำการตรวจสอบปริมาณไวรัส เทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) ด้วยเทคนิค qPCR (ตามที่ระบุไว้ในหัวข้อ 3.6.3.2) และทำการวิเคราะห์ผลการทดลอง (Mendoza-Cano and Sanchez-Paz, 2013)

3.6.3.1 สกัด genomic DNA (gDNA)

1. เก็บตัวอย่างเหงือกกึ่ง ใส่หลอด 1.5-ml เติม FATG1 buffer ปริมาตร 200 μl และทำการบดให้เป็นเนื้อเดียว
2. เติม Proteinase K (10mg/ml) ปริมาตร 20 μl และทำให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex และนำไปบ่มไปที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
3. จากนั้นเติม FATG2 Buffer ปริมาตร 200 μl และทำให้เข้ากันโดย vortex และนำไปบ่ม 70 °C เป็นเวลา 10 นาที
4. จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 xg เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตสารละลายส่วนใสไปใส่หลอด 1.5-ml ใหม่
5. เติม Absolute ethanol 200 μl และทำให้เข้ากันโดย vortex และ spin down
6. ประกอบ Column ปิเปตสารละลายทั้งหมดใส่ Column และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 xg เป็นเวลา 1 นาที และเทสารละลายใน collection tube ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. เติม W1 Buffer 400 μl และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 xg เป็นเวลา 1 นาที และเทสารละลายใน collection tube ที่ตั้ง
8. เติม Wash Buffer 750 μl และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 xg เป็นเวลา 1 นาที และเทสารละลายใน collection tube ที่ตั้ง จากนั้นทำการ air dry column โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 xg เป็นเวลา 3 นาที
9. เติม Elution buffer ที่ผ่านการให้ความร้อนแล้ว 30-50 μl โดยหยดลงตรงกลาง column ที่ตั้งไว้ 3 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 xg เป็นเวลา 2 นาที เพื่อ elute genomic DNA
10. นำไปวัดความเข้มข้นด้วย nanodrop spectrophotometer และตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis (ตามที่ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.2)

3.6.4.2 quantitative PCR

การทำกราฟมาตรฐาน (standard curve)

การสร้าง standard curve ที่มีปริมาณไวรัส 10^3 - 10^7 viral copies จากนั้นนำตัวอย่าง gDNA ที่ความเข้มข้นเท่า ๆ กันมาทำการตรวจสอบการหาปริมาณไวรัสด้วยเทคนิค qPCR

1. ทำการเจือจางพลาสติกที่ความเข้มข้น 10^{-1} ถึง 10^{-8} โดยการเตรียมหลอด 1.5-ml ทั้งหมด 8 หลอด
2. หลอดที่ 1 ต้องการปรับความเข้มข้นจาก 10 ng/ μl ให้ได้ 1.88 ng/ μl ใส่พลาสติก 3.8 μl ใส่ น้ำ UP H₂O 16.2 μl หลอดที่ 2-8 ใส่พลาสติก 2 μl ใส่ น้ำ UP H₂O 18 μl
3. นำพลาสติกที่ความเข้มข้น 10^{-4} - 10^{-8} มาทำ qPCR ที่ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ โดยเตรียมส่วนประกอบสำหรับการทำ qPCR (ตามที่ระบุไว้ในตารางที่ 3.15) และใช้อุณหภูมิตามที่ระบุไว้ในตารางที่ 3.2
4. นำ gDNA ที่สกัดได้ในกลุ่มตัวอย่าง (ตามที่ระบุไว้ในหัวข้อ 3.6.1) มาปรับความเข้มข้นให้ได้ประมาณ 100 ng/ μl ด้วยน้ำ UP H₂O จากนั้นนำไปใช้เป็นแม่แบบในการตรวจสอบปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV copy number) โดยเตรียมส่วนประกอบสำหรับการทำ qPCR (ตามที่ระบุไว้ในตารางที่ 3.16) และใช้อุณหภูมิตามที่ระบุไว้ในตารางที่ 3.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.15 แสดงส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา qPCR (PCR reaction)

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μl)
Luna qPCR mix enzyme (NEB)	5
10 μM forward primer	0.15
10 μM reverse primer	0.15
UP H ₂ O	3.7
Standard plasmid	1
Total Volume (master mix = 9 μl)	10

ตารางที่ 3.16 แสดงส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา qPCR (PCR reaction)

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μl)
Luna qPCR mix enzyme (NEB)	5
10 μM forward primer	0.15
10 μM reverse primer	0.15
UP H ₂ O	3.7
gDNA template	1
Total Volume (master mix = 9 μl)	10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมของยีน ATG14

4.1.1 การค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์

จากการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ ATG14 ในกิ้ง *Penaeus vannamei* และสัตว์ชนิดอื่นที่ใกล้เคียง ผ่านฐานข้อมูล NCBI พบว่ามี accession number MH797017.1 และมี open reading frame ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1467 คู่เบส ซึ่งสามารถ translate เป็นกรดอะมิโน 488 ตัว (แสดงในภาพที่ 4.1)

```

atgtgtcgtcaacttcotcagatgatctacgccacccttattcaagtggcactcaat
M S S L T S S D D L T P P L F Q V A S N
gtggaggatcgggtgcccgagacaacagaaagtggaaggtgtccactatgtaadag
V E G Y G A R D N T K V E R C P L C N Q
aaaacagaggcattctattgtaagaaatgtgaggaatggaaactctatcactcggga
K T E A F Y C K E C V R N G N F Y H S R
atgaaagctgccagaacggtacgccgacaagaaactgaggtattatcggctgaggaagaaa
M K L P E R V A D K K L R Y Y R L R K E
ctgctggagcaagagggaggtgacggctgcaccagaagaagcaggccacctgctg
L L E Q E E E V T R L H Q T K T R H L L
ttgaaaggagcgaatcaaggaaatgcaagagaggggtatcgtcgtgaaactggcctagac
L K E R I K E V Q E R V S I L K L V I D
agtacaaaaggatattcacaagtgaaaacccagagtgctgagctgtccaactaat
S T K E D I S Q V K T Q S A E L S N T N
gctatggcgccagcagctccctctctctccagcagagactgtcgaagatgaggaatac
A M R R Q Q L P L F Q Q R L S K M R K T
cttcccaataccaagagagatctgtgacaagagagaacaactcgtctattagtggagct
L H Q Y Q E K I R D K R E Q L A I S E A
cagctgaaaggtgtgtctgtggcaataataagacagctaaagcagatacatattccaatt
Q L K G V V R G N I R Q L T B Y I F P I
acagaagtccaaccagctagaagctggataactgatccagagcacttgatacgtgataca
T E V Q P A R S V D T D P E H L D T V S
gcaatgagagggcatcacaactacataatgtaagaggtcgtgggtatataccgatact
A I A E A S Q T T Y V R G R W V Y T D T
tccatgagacacagtatcgtcattgttcaaccgaggtaccaggaatcggagactctct
S H E T Q Y R I V H P M L P G S G D Y S
gctataatctttgtctgtgggtgcaagtggaggtgagctgagggagagtgatggaaa
A Y N L L S V G A S G G E C E E S D G E
gagagatcggaggtacagtatctgtgctggctcaactatcttacacagcttctcaac
E R S G G Y S I C A G L T Y L T Q L V N
agacttgcatttatctggatgttactttaccaagaagctcctgctacagtgaaattctgc
T I A F Y L D V T L P K K L C Y S E F C
agaaatgagctgggtgaacagcagtttgcaagcgtgttgcaagacttaatacaaaata
R N E L G E Q Q F A R R V A R L N T N T
atatactgtgtgtgtcaaaatgtgcccgttaaattgctgcgacctacacacagtatg
I Y L C L S Q N V F A K L L R P T H S M
cctaacctgttagccctctctgatcagcagatagcagatctggcaggcaaggagcttt
P N L L A L L D T Q I A D L G R Q G S F
gagattgcaggtcctgtgtggagagcatggagatggcatggaagatgacaatgctggag
E I A E S L L E S M E D G M E D D N A E
ggttcagattctgaggaagaagaagatacggacacactctcgtcgtgagtggaactgta
G S D S E E E E D T D T L S A E W E T V
ccaaacctgcctttatggaaacccttagtgccaaccacacagactttctgacattt
P N L P L L E P P L V P T H Q T F S T F
aattctacagccgtgtactcccaggaacaatgggtcatgagggcctggatgggtatg
N S T A V Y S Q A T M G H A G P G M G M
ggtactggagctgggtggcattgtttctcagcagcgtctcagttatctctctgtcaga
G T G A G G I V S S A A A S V I S L F R
ggttttgggtgctcagaacaagtga
G F G G A Q N K -

```

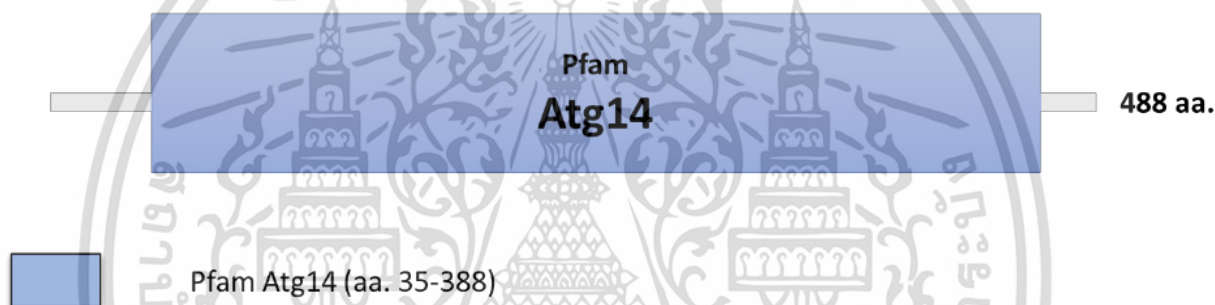
ภาพที่ 4.1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ ATG14 ของกิ้ง *Penaeus vannamei*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 การทำนาย conserved domain

จากการนำลำดับกรดอะมิโนของ ATG14 มาทำนาย conserved domain พบว่ามี 1 conserved domain คือ ATG14 ที่ลำดับกรดอะมิโน 35-388 ซึ่งมี coiled-coil domains (CCDs) ที่ปลาย N-terminal จำเป็นสำหรับการจับกับ beclin-1 และกระตุ้นการตอบสนองของออโตฟาจีในเซลล์ตามปกติ (แสดงในภาพที่ 4.2)

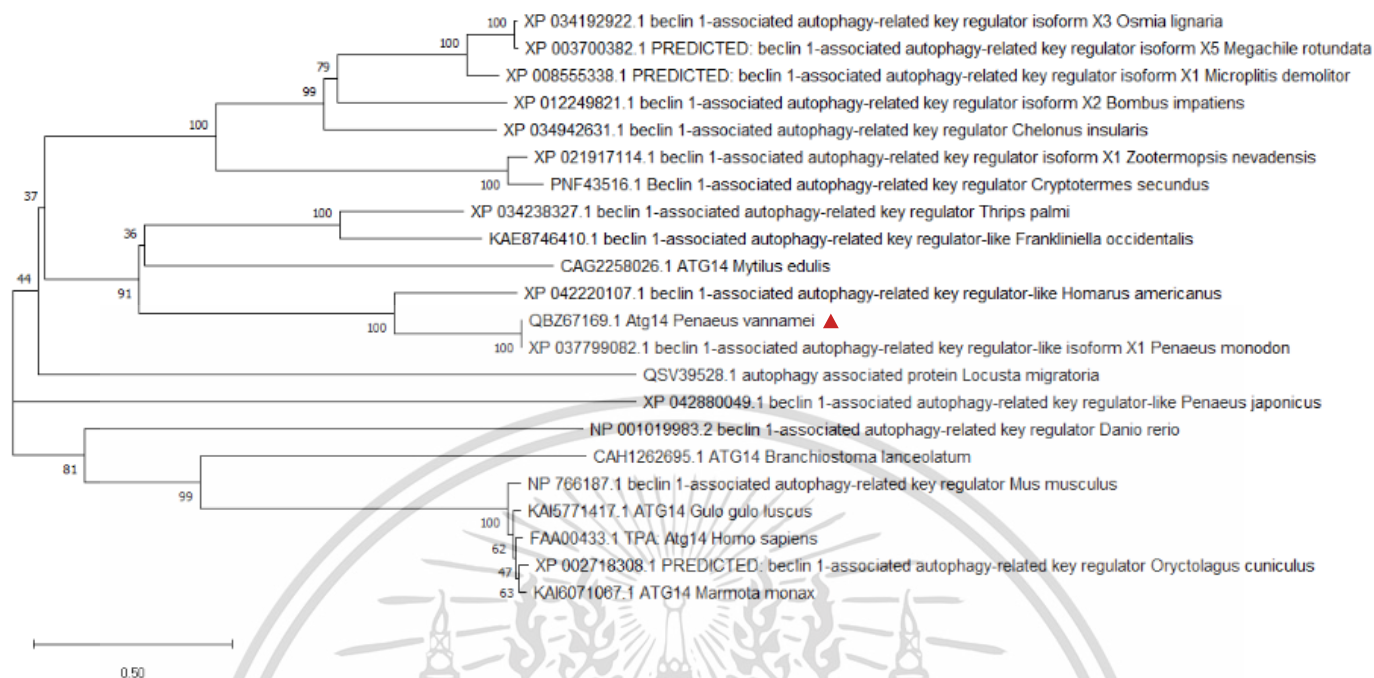
ในงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่า conserved domain ในยีสต์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมี 1 โดเมน คือ ATG14 ตั้งอยู่ที่กรดอะมิโน 35-367 ในยีสต์มี 2 coiled-coil domains (CCDs) ที่ปลาย N-terminal ซึ่งจำเป็นสำหรับการจับกับ Atg6/Beclin-1 และทำให้เกิดออโตฟาจี (Obara et al., 2006) ส่วนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ที่ปลาย N-terminal มี CCDs ที่ซับซ้อน 3 ตัว (Matsunaga et al., 2009)



ภาพที่ 4.2 แสดงข้อมูลเกี่ยวกับ conserved domain โปรตีน ATG14

4.1.3 การสร้าง phylogenetic tree

จากแผนภูมิความสัมพันธ์ของ ATG14 พบว่าสามารถจัดกลุ่มตาม phylum ได้ 3 ประเภทคือ Arthropoda Chordata และ Mollusca โดย ATG14 ของกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับพวก Arthropoda ซึ่งมีความใกล้เคียงกับ ATG14 ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) มากที่สุด พบว่ามี %identity และ %Similarity = 99.6%

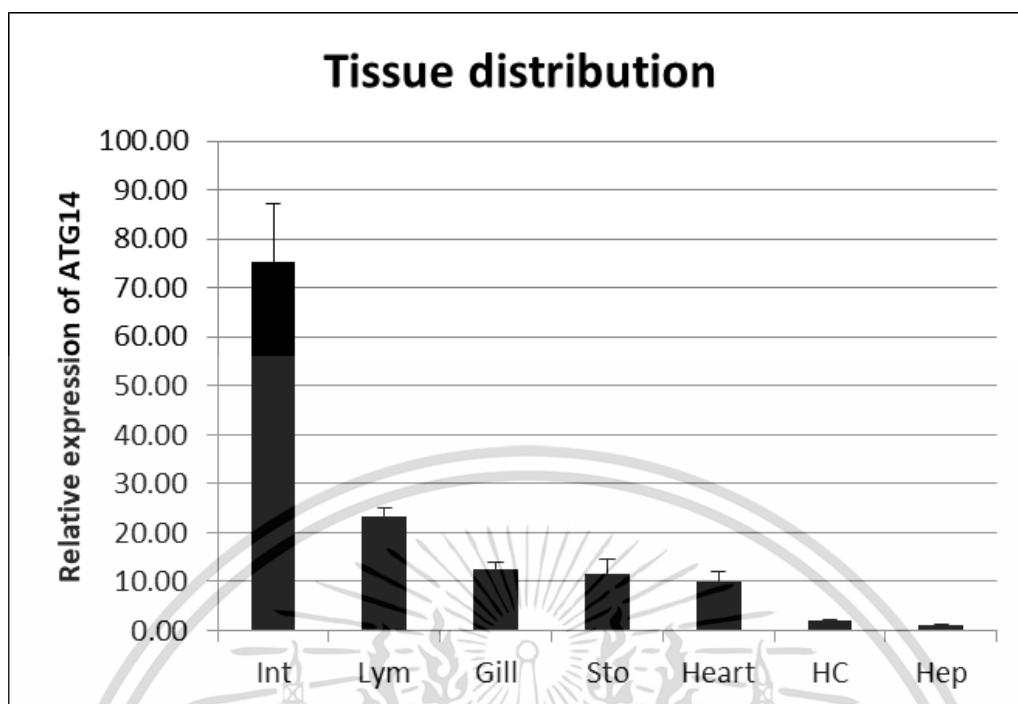


ภาพที่ 4.3 แสดงแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของโปรตีน ATG14

4.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน ATG14 ในเนื้อเยื่อถุงปกติ

จากกราฟแสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน ATG14 ในเนื้อเยื่อถุงปกติพบว่ายีน ATG14 แสดงออกมากที่สุดใน ลำไส้ (Intestine) ตามด้วยต่อมน้ำเหลือง (Lymphoid organ) เหงือก (Gill) กระเพาะ (Stomach) หัวใจ (Heart) เลือด (Hemocyte) แสดงออกน้อยที่สุดใน ตับและตับอ่อน (Hepatopancreas) (แสดงในภาพที่ 4.4) แต่มีงานวิจัยที่ศึกษาการแสดงออกของยีน ATG14 ในเนื้อเยื่อถุง *Procambarus clarkii* ที่ปกติ พบว่ายีน ATG14 แสดงออกมากที่สุดใน ตับและตับอ่อน (Zhu et al., 2022)

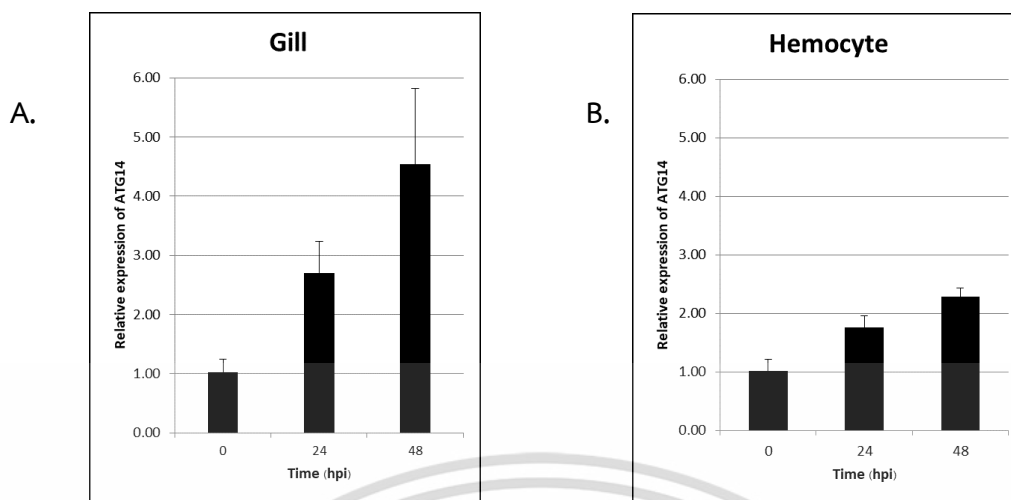
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 แสดงผลการแสดงออกของยีน ATG14 ในเนื้อเยื่อต่างๆ

4.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน ATG14 ในกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว

จากผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน ATG14 ในกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว พบว่าหลังจากกุ้งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ 24 และ 48 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่ายีน ATG14 มีการแสดงออกมากขึ้นเมื่อเทียบกับเวลาการติดเชื้อที่ 0 ชั่วโมง (แสดงในภาพที่ 4.5) จึงสามารถสรุปได้ว่ายีน ATG14 มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Zhu et al., 2022) ที่พบว่าการแสดงออกของยีน ATG14 เมื่อติดเชื้อไวรัส ในเซลล์เม็ดเลือดและเหงือก พบว่ามีการแสดงออกมากขึ้น บ่งชี้ให้เห็นว่า ATG14 มีบทบาทบางอย่างในการตอบสนองต่อการติดเชื้อ WSSV



ภาพที่ 4.5 การแสดงออกของยีน ATG14 หลังติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

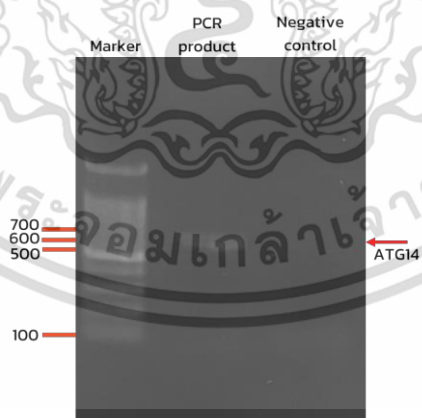
A: การแสดงออกของยีน ATG14 ในเหงือก (Gill) กุ้งหลังติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

B: การแสดงออกของยีน ATG14 ในเลือด (Hemocyte) กุ้งหลังติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

4.4 การสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับยีน ATG14

4.4.1 การเพิ่มจำนวนยีน ATG14 ด้วยเทคนิค PCR (PCR amplification)

จากการเพิ่มจำนวนยีน ATG14 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ cDNA ของกุ้งขาวเป็นแม่แบบและนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบว่า PCR product ที่ได้มีขนาดประมาณ 600 bp (แสดงในภาพ 4.6) ซึ่งตรงกับขนาดของชิ้นยีน ATG14 ตามคู่ primer ที่ได้ออกแบบไว้ จากนั้นนำไปตรวจสอบความเข้มข้นและคุณภาพด้วย nanodrop spectrophotometer ได้ผลตรวจสอบตามตารางที่ 4.1

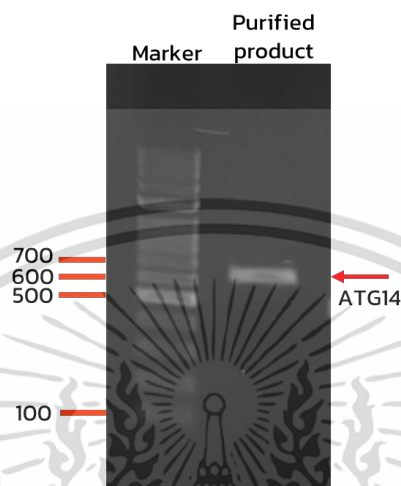


ภาพที่ 4.6 แสดงผลการตรวจสอบคุณภาพของ PCR product ของยีนด้วยเทคนิค agarose gel Electrophoresis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2 การทำชิ้นยีน ATG14 ให้บริสุทธิ์ (purification of PCR product)

จากผลการทำชิ้นยีน ATG14 ให้บริสุทธิ์และนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบชิ้น purified ATG14 ที่ขนาดประมาณ 600 bp



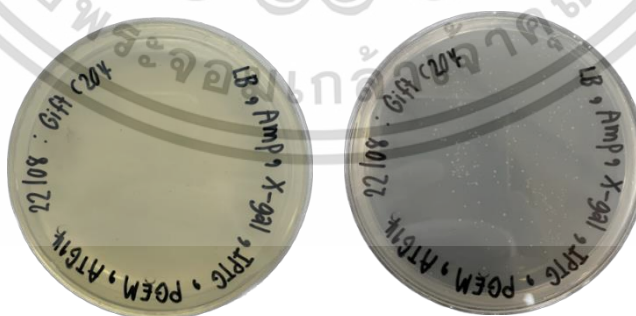
ภาพที่ 4.7 แสดงผลการตรวจสอบคุณภาพของ purified PCR product ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

ตารางที่ 4.1 ผลการวัดความเข้มข้น purified PCR product ด้วย nanodrop spectrophotometer

ชื่อยีน	ความเข้มข้น	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
purified_ATG14	15 ng/ μ l	1.58	1.46

4.4.3 การทดลอง Transformation (Blue-white screening)

จากผลการคัดเลือกด้วยเทคนิค Blue-white screening จะเห็นว่ามีทั้งโคโลนีสีขาว และสีฟ้า (แสดงในภาพ 4.8) ซึ่งจะนำโคโลนีสีขาวไปทำการตรวจสอบต่อไป

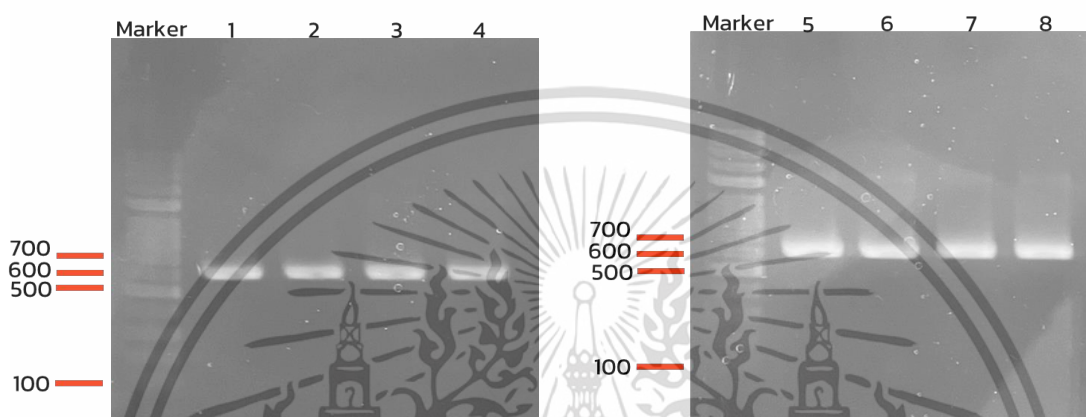


ภาพที่ 4.8 แสดงผลการคัดเลือกโคโลนี ด้วยเทคนิค Blue-white screening

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.4 การคัดเลือกโคโลนีด้วยเทคนิค colony PCR

จากการนำโคโลนีสีขาว มาเป็นแม่แบบในการทำ PCR และตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ผลการทดลองพบ PCR product ขนาดประมาณ 600 bp ทุกโคโลนี (แสดงในภาพที่ 4.9) ซึ่งคาดว่าเป็นส่วนของยีน ATG14 จากนั้นเลือก 2 โคโลนี คือ โคโลนีที่ 2 และ 3 โดยนำโคโลนีที่เลือกมาไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-amp ข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) แล้วนำมาสกัด plasmid ต่อไป

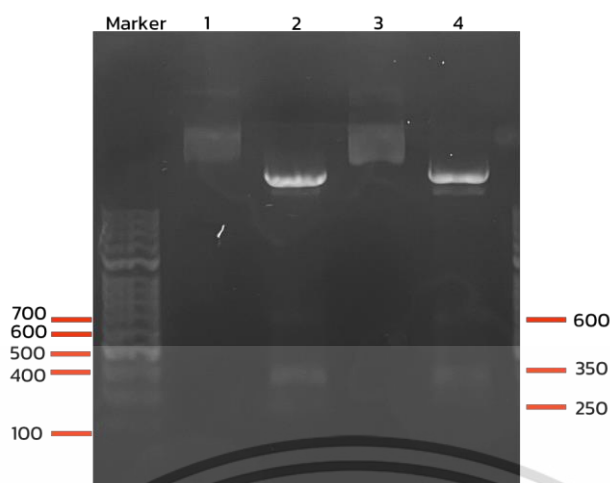


ภาพที่ 4.9 แสดงผลการคัดเลือกโคโลนีจากการทำ colony PCR และตรวจสอบด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis

4.4.5 การเลือกโคลนโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) *EcoRI*

นำพลาสมิดที่สกัดได้ (จากตาราง 4.2) มาทำการ cut check ด้วย restriction enzyme *EcoRI* พบว่ามี PCR product 3 ชิ้นที่ขนาด 600 bp 350 bp และ 250 bp ที่ lane 2 และ 4 (แสดงในภาพ 4.10) เพราะเอนไซม์ *EcoRI* ตัดขึ้นยีน ATG14 ที่ใส่เข้าไปในเวกเตอร์ pGEM-T easy ทำให้เกิด PCR product ขนาด 600 bp และเอนไซม์ *EcoRI* ก็สามารถตัดขึ้นยีน ATG14 ทำให้เห็นชิ้น DNA ขนาด 350 bp และ 250 bp จากผลการทดลองนี้ จึงสรุปได้ว่าสามารถสร้างพลาสมิด pGEM-T/ATG14 ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.10 แสดงผลการตรวจสอบการคัดเลือกโคลนี่ด้วยการใช้ *EcoRI* ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

lane Marker 100bp DNA marker
 lane 1 uncut pGEM-T/ATG14 no.1
 lane 2 cut pGEM-T/ATG14 no.1
 lane 3 uncut pGEM-T/ATG14 no.2
 lane 4 cut pGEM-T/ATG14 no.2

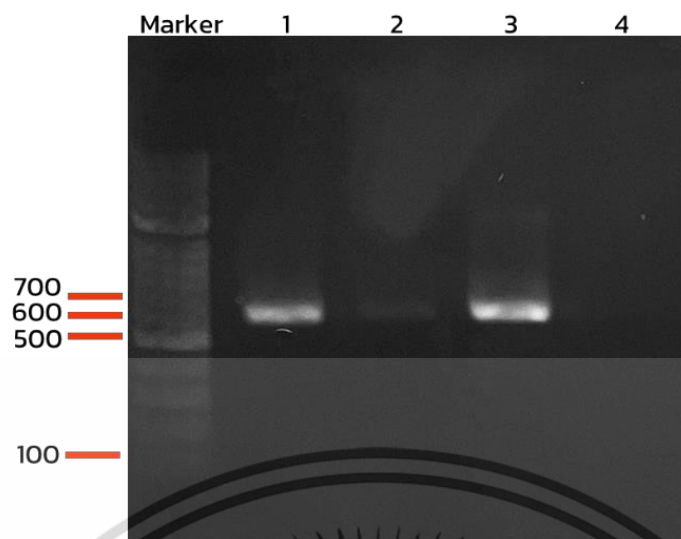
ตารางที่ 4.2 ผลการวัดความเข้มข้นของพลาสมิดด้วย nanodrop spectrophotometer

ชื่อยีน	ความเข้มข้น	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
pGEM-T/ATG14 no.1	240.4 ng/ μ l	1.87	2.21
pGEM-T/ATG14 no.2	195.8 ng/ μ l	1.86	2.17

4.4.6 การเพิ่มจำนวนยีน ATG14 และต่อ T7 promotor ด้วยเทคนิค PCR (PCR amplification)

จากการเพิ่มจำนวนยีน ATG14 ด้วย promotor ที่มีส่วนของ T7 promotor ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ pGEM-T/ATG14 เป็นแม่แบบ เมื่อนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบ PCR product ขนาดประมาณ 600 bp (แสดงในภาพที่ 4.11) ซึ่งคาดว่าเป็นยีน ATG14 ที่มีส่วนของ T7 promotor

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.11 ผลการตรวจสอบ PCR product ของยีน ATG14 ที่มีส่วนร่วมของ T7 promotor ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

lane Marker 100bp DNA marker

lane 1 PCR product DNA ATG14 (primer T7F/R)

lane 2 negative control (primer T7F/R)

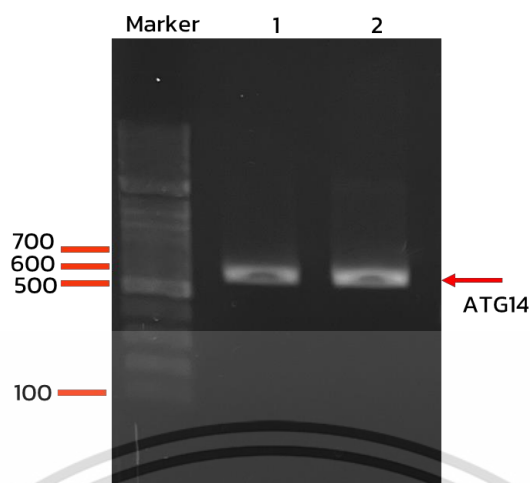
lane 3 PCR product DNA ATG14 (primer F/T7R)

lane 4 negative control (primer F/T7R)

4.4.7 การทำชิ้นยีน ATG14 ที่มีส่วนของ T7 promotor ให้บริสุทธิ์ (purification of PCR product)

จากผลการทำชิ้นยีน ATG14 ที่มีส่วนของ T7 promotor ให้บริสุทธิ์และนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบชิ้น purified ATG14 ที่ต่อด้วย T7 promotor ขนาดประมาณ 600 bp (แสดงในภาพที่ 4.12) จากนั้นนำไปตรวจสอบความเข้มข้นและคุณภาพด้วย nanodrop spectrophotometer ได้ผลตรวจสอบตามตารางที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.12 แสดงผลการตรวจสอบชิ้นยีน purified PCR product ATG14-T7F/R และ ATG14-F/T7R ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

lane Marker 100bp DNA marker

lane 1 Purified ATG14-T7F/R

lane 2 Purified ATG14-F/T7R

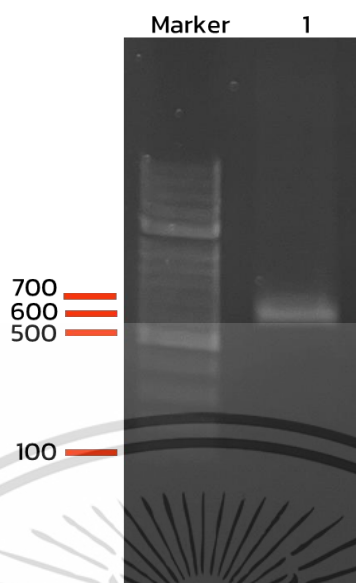
ตารางที่ 4.3 ผลการวัดความเข้มข้น purified PCR product ของชิ้นยีน ATG14 ที่ต่อด้วย T7 promotor ด้วย nanodrop spectrophotometer

ชื่อยีน	ความเข้มข้น	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
ATG14-T7F/R	194.5 ng/ μ l	1.75	1.79
ATG14-F/T7R	219.9 ng/ μ l	1.84	2.08

4.4.8 การสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ ที่จำเพาะกับยีน ATG14 (dsATG14)

จากการสร้าง dsATG14 ด้วยชุด T7 Ribomax™ Express Large Scale RNA production system (Promega) และตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบ band ขนาดประมาณ 600-700 bp (แสดงในภาพที่ 4.13) และเมื่อตรวจสอบความเข้มข้นด้วย nanodrop spectrophotometer พบว่ามี ความเข้มข้น 3.185 ng/ μ l (ตามตารางที่ 4.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.13 แสดงผลการตรวจสอบ dsATG14 ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis

lane Marker 100bp DNA marker

lane 1 dsATG14

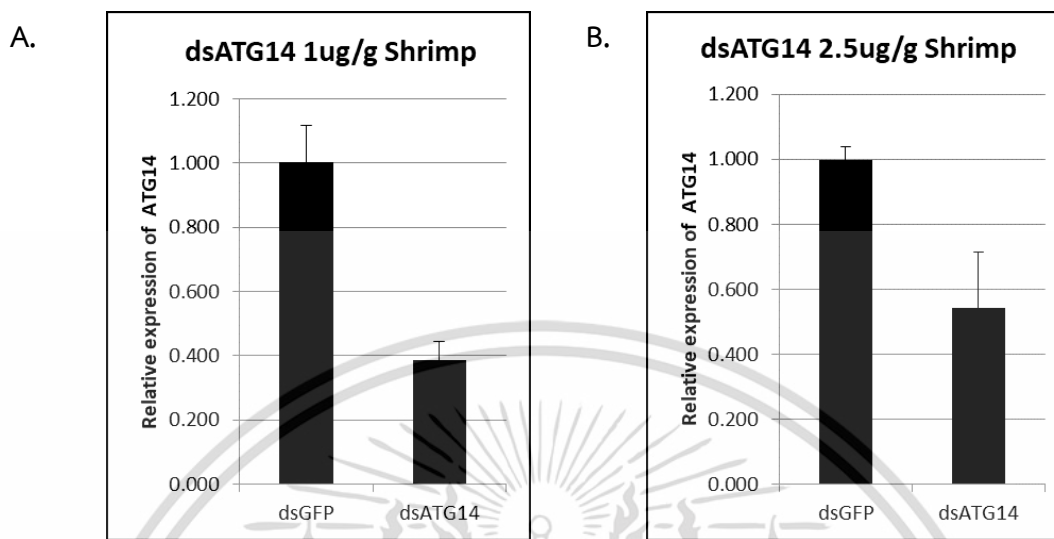
ตารางที่ 4.4 แสดงผลการวัดความเข้มข้น dsATG14 ด้วย nanodrop spectrophotometer

ชื่อยีน	ความเข้มข้น	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
dsATG14	3.185 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	2.04	2.16

4.5 การตรวจสอบประสิทธิภาพของ dsATG14 ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน ATG14 ในกุ้ง

จากผลการทดสอบพบว่า กุ้งกลุ่มที่ฉีด dsATG14 ความเข้มข้น 1 และ 2.5 $\mu\text{g}/\text{กรัม}$ กุ้ง สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน ATG14 ได้ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม คือกุ้งที่ฉีดด้วย dsGFP (แสดงในภาพที่ 4.14) จากผลการทดลองนี้จึงเลือกใช้ dsATG14 ที่ความเข้มข้น 1 $\mu\text{g}/\text{กรัม}$ กุ้ง ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน ATG14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

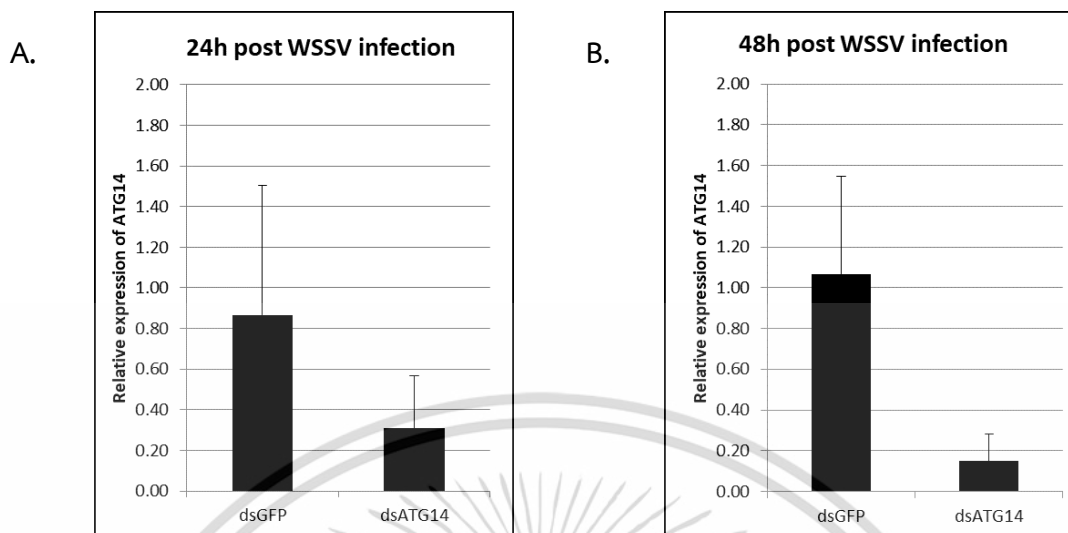


ภาพที่ 4.14 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน ATG14 เมื่อถูกยับยั้งการแสดงออก
 A: การแสดงออกของยีน ATG14 ในกลุ่มที่ฉีด dsATG14 ที่ความเข้มข้น 1 µg/กรัมกุ้ง
 B: การแสดงออกของยีน ATG14 ในกลุ่มที่ฉีด dsATG14 ที่ความเข้มข้น 2.5 µg/กรัมกุ้ง

4.6 การศึกษาบทบาทของยีน ATG14 ในกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว

4.6.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน ATG14 และยีนไวรัส VP28

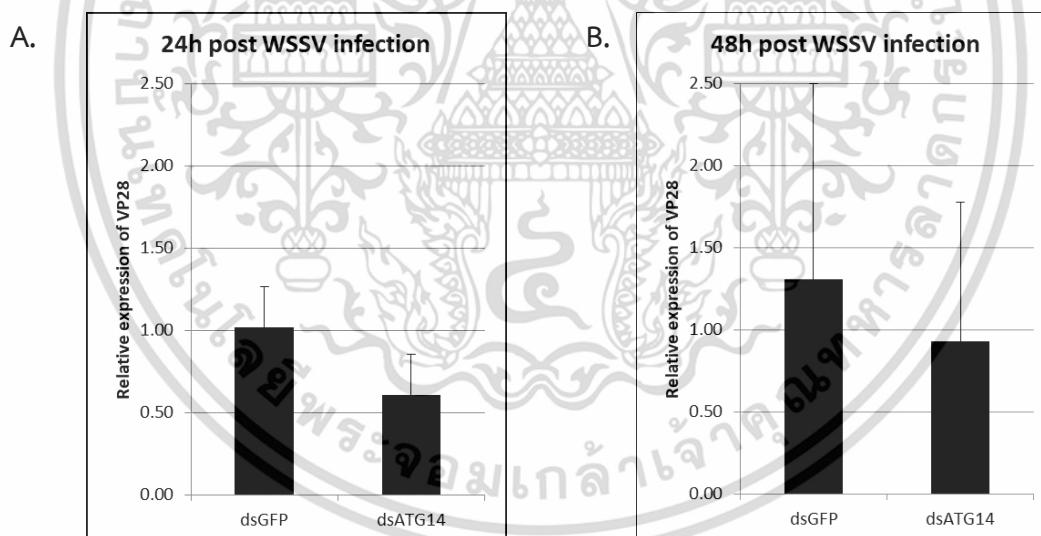
เริ่มจากการศึกษาบทบาทของยีน ATG14 ในเหงือกกุ้ง จากผลการทดลองพบว่า หลังติดโรคตัวแดงดวงขาว ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ในเหงือกกุ้งกลุ่มที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน ATG14 ด้วย dsATG14 มีการแสดงออกของยีน ATG14 ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (แสดงในภาพที่ 4.15) และเมื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนไวรัส VP28 ซึ่งเป็นยีนที่พบมากที่สุดไวรัสตัวแดงดวงขาว จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า หลังการติดโรคตัวแดงดวงขาวที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ในเหงือกกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน ATG14 พบว่าการแสดงออกของยีน VP28 ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (แสดงในภาพที่ 4.16)



ภาพที่ 4.15 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน ATG14 ในเหงือกกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว

A: การแสดงออกของยีน ATG14 ในเหงือกกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาวที่เวลา 24 ชั่วโมง

B: การแสดงออกของยีน ATG14 ในเหงือกกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาวที่เวลา 48 ชั่วโมง



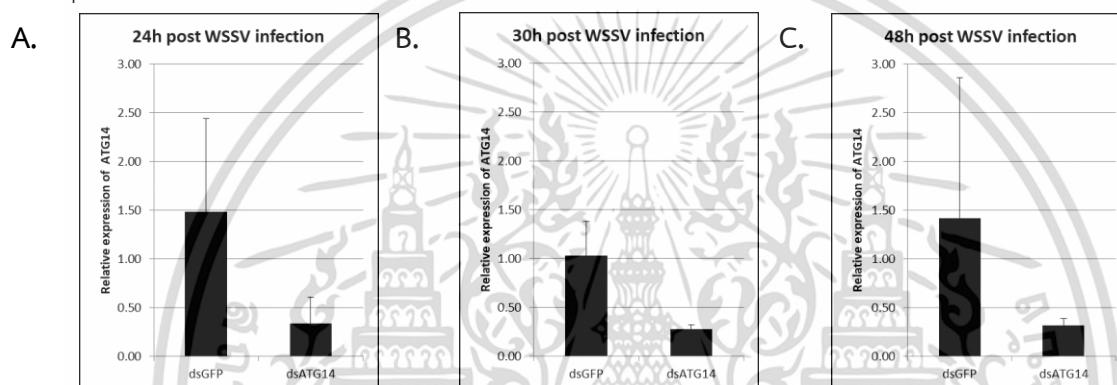
ภาพที่ 4.16 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน VP28 ในเหงือกกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว

A: การแสดงออกของยีน VP28 ในเหงือกกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาวที่เวลา 24 ชั่วโมง

B: การแสดงออกของยีน VP28 ในเหงือกกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาวที่เวลา 48 ชั่วโมง

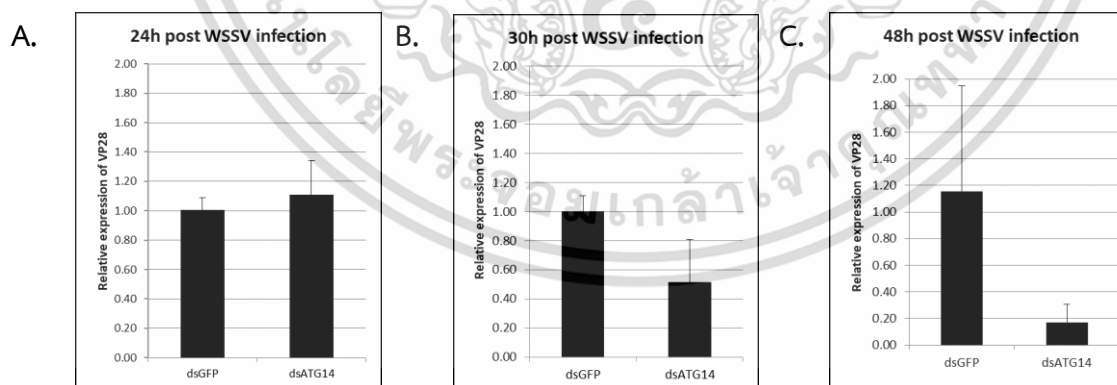
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาบทบาทของยีน ATG14 ในเลือดของกุ้ง โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดกุ้ง หลังติดโรคตัวแดงดวงขาวที่เวลา 24 30 และ 48 ชั่วโมง และตรวจสอบการแสดงออกของยีน ATG14 ด้วยเทคนิค qPCR พบว่าหลังการติดโรคตัวแดงดวงขาวที่ 24 30 และ 48 ชั่วโมง ในเลือดกุ้งที่ถูกฉีดด้วย dsATG14 มีการแสดงออกของยีน ATG14 ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (แสดงในภาพที่ 4.17) และเมื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน VP28 ในเลือดของกุ้ง จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าที่ 30 และ 48 ชั่วโมงหลังการติดโรคตัวแดงดวงขาว ในกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน ATG14 พบว่ามีการแสดงออกของยีน VP28 ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมแต่เวลาที่ 24 ชั่วโมงหลังการติดโรคตัวแดงดวงขาว การแสดงออกของยีน VP28 ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม (แสดงในภาพที่ 4.18)



ภาพที่ 4.17 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน ATG14 ในเลือดกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว

- A: การแสดงออกของยีน ATG14 ในเลือดกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาวที่เวลา 24 ชั่วโมง
 B: การแสดงออกของยีน ATG14 ในเลือดกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาวที่เวลา 30 ชั่วโมง
 C: การแสดงออกของยีน ATG14 ในเลือดกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาวที่เวลา 48 ชั่วโมง



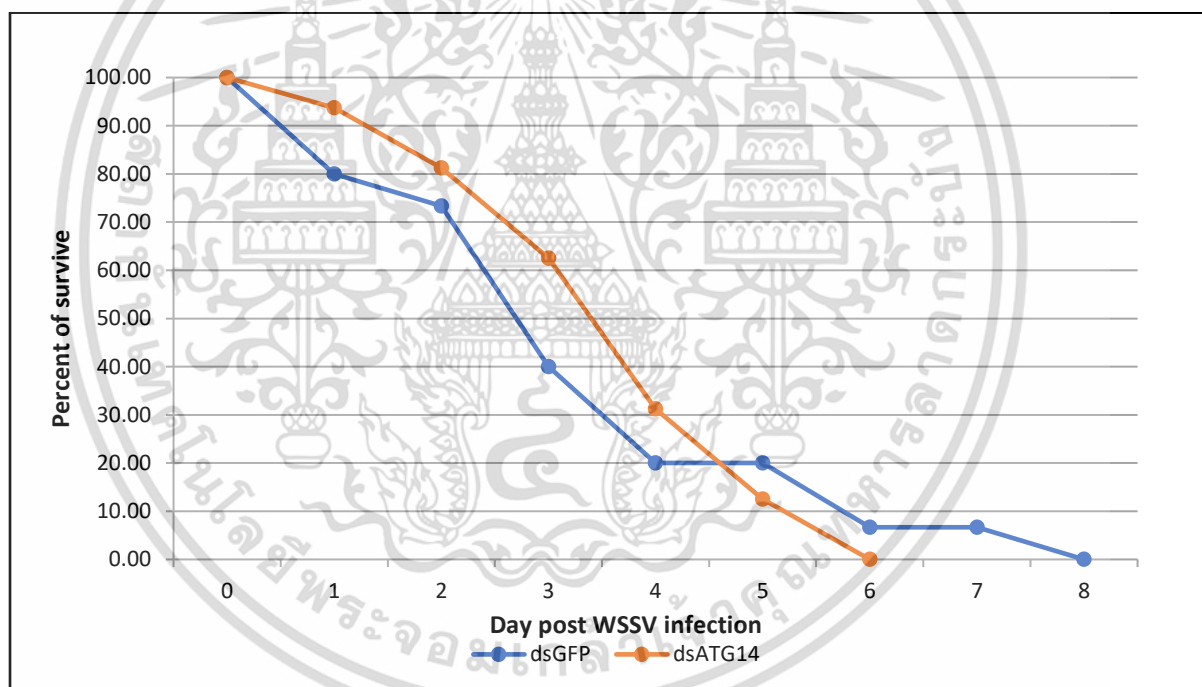
ภาพที่ 4.18 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน ATG14 ในเลือดกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว

- A: การแสดงออกของยีน VP28 ในเลือดกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาวที่เวลา 24 ชั่วโมง
 B: การแสดงออกของยีน VP28 ในเลือดกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาวที่เวลา 30 ชั่วโมง
 C: การแสดงออกของยีน VP28 ในเลือดกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาวที่เวลา 48 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6.2 การติดตามอัตราการตายของกุ้ง

จากการติดตามอัตราการตายของกุ้ง ที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาวทั้งในกลุ่มควบคุม และในกลุ่มยับยั้งการแสดงออกของยีน ATG14 เป็นเวลา 8 วัน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากุ้งกลุ่มที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน ATG14 ช่วงที่ติดไวรัส 1-4 วันแรก มีอัตราการตายช้ากว่ากลุ่มควบคุม หลังจากติดไวรัสเข้าวันที่ 5 จนถึงวันที่ 8 กุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน ATG14 เริ่มตายเร็วกว่ากลุ่มควบคุม (แสดงในภาพที่ 4.20) โดยพบว่ากุ้งกลุ่มที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน ATG14 จะตาย 100% ที่วันที่ 6 หลังจากติดเชื้อ และกุ้งกลุ่มควบคุมจะตาย 100% ที่วันที่ 8 หลังจากติดเชื้อไวรัส ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่ากุ้งกลุ่มที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน ATG14 มีการตายสะสมเร็วกว่ากุ้งกลุ่มควบคุม ซึ่งต่างจากผลการวิจัยที่ผ่านมา ๆ มา ที่มีการรายงานพบว่า ในกุ้ง *P. clarkii* เมื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน ATG14 สามารถลดอัตราการตาย และยับยั้งการจำลองแบบของไวรัสได้ ซึ่งบ่งชี้ว่ายีน ATG14 อาจส่งเสริม WSSV ในการติดไวรัสในกุ้ง *P. clarkia* (Zhu et al., 2022)

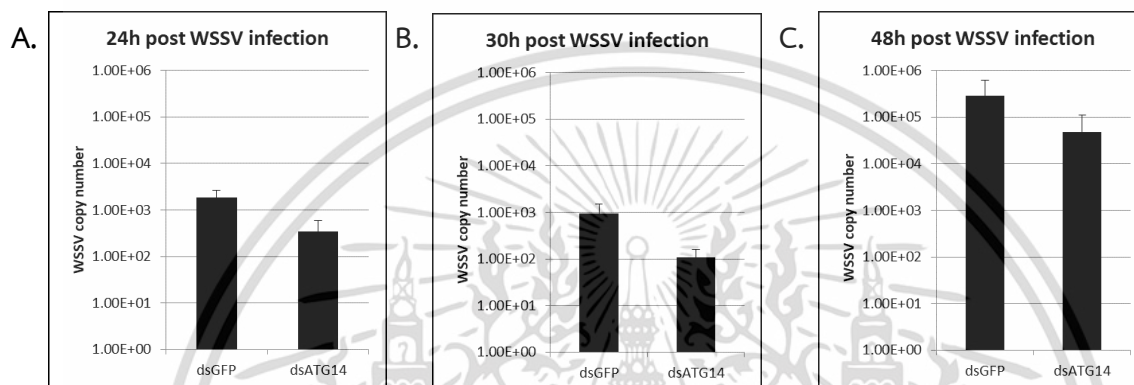


ภาพที่ 4.19 แสดงอัตราการอยู่ตายของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเมื่อถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน ATG14 ด้วย dsATG14 เทียบกับกุ้งกลุ่มควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6.3 การตรวจสอบปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV copy number)

จากผลการตรวจสอบปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV copy number) ที่เวลา 24 30 และ 48 ชั่วโมง พบว่ากึ่งกลุ่มที่ยับยั้งการแสดงออกของยีน ATG14 มีปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาวลดลง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (แสดงในภาพที่ 4.20) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Zhu et al., 2022) ที่พบว่า WSSV copy number มีปริมาณไวรัสลดลง และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมากหลังจาก 48 ชั่วโมงเทียบกับ 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.20 แสดงผลการตรวจสอบปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาว ในกึ่งหลังติดโรคตัวแดงดวงขาว

- A: ปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาว ในกึ่งหลังติดโรคตัวแดงดวงขาว ที่เวลา 24 ชั่วโมง
- B: ปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาว ในกึ่งหลังติดโรคตัวแดงดวงขาว ที่เวลา 30 ชั่วโมง
- C: ปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาว ในกึ่งหลังติดโรคตัวแดงดวงขาว ที่เวลา 48 ชั่วโมง

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการค้นหาและวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมของยีน ATG14 ในกุ้งขาว มี open reading frame ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1467 คู่เบส ซึ่งสามารถ translate เป็นกรดอะมิโน 488 ตัว มีความใกล้เคียงกับ ATG14 ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ในเนื้อเยื่อที่พบว่ายีน ATG14 แสดงออกมากที่สุด ในลำไส้ (Intestine) พบว่า ATG14 มี 1 conserved domain และทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน ATG14 ในกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาวพบว่ายีน ATG14 มีการแสดงออกมากขึ้น ทั้งในเลือดและในเหงือกกุ้ง จากผลการทดลองนี้พบว่าการแสดงออกของยีน ATG14 มีความเกี่ยวข้องกับการติดโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้ง ดังนั้นจึงทำการศึกษาบทบาทของยีน ATG14 ในกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาวด้วยเทคนิค RNA interference พบว่าอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับยีน ATG14 หรือ dsATG14 ที่ความเข้มข้น 1 $\mu\text{g}/\text{กรัม}$ กุ้ง สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน ATG14 ได้ เมื่อทำการยับยั้งการแสดงออกของยีน ATG14 ในกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาวพบว่า มีการแสดงออกของยีน VP28 ลดลง และเมื่อตรวจสอบปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV copy number) พบว่ากุ้งกลุ่มที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน ATG14 มีปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาวลดลง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่จากผลการตรวจสอบอัตราการตาย ช่วงที่ติดไวรัส 1-4 วันแรก มีอัตราการตายช้ากว่ากลุ่มควบคุม หลังจากติดไวรัสเข้าวันที่ 5 จนถึงวันที่ 8 กุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน ATG14 เริ่มตายเร็วกว่ากลุ่มควบคุม พบว่ากุ้งกลุ่มที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน ATG14 มีอัตราการตาย 100% ที่เร็วกว่ากลุ่มควบคุม

จากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปผลการทดลองได้ว่ายีน ATG14 มีบทบาทเกี่ยวข้องในการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้ง การแสดงออกที่ลดลงของยีน ATG14 ส่งผลให้กุ้งติดโรคตัวแดงดวงขาวลดลงในระยะแรกของการติดโรค เพราะฉะนั้นการพัฒนาสารต้านไวรัส (antiviral agent) ที่มีรูปแบบเป็นอาร์เอ็นเอสายคู่ (dsRNA) ที่จำเพาะกับยีน ATG14 หรือ dsATG14 เพื่อลดปริมาณไวรัส และเพิ่มอัตราการรอดของกุ้ง ในระยะแรกของการติดโรคตัวแดงดวงขาว อาจจะเป็นแนวทางหนึ่งในการยับยั้งการแพร่ระบาดของโรคตัวแดงดวงขาว ในอุตสาหกรรมกุ้งได้ ซึ่งในส่วนนี้ต้องทำงานวิจัยเพิ่มเติม

5.2 ข้อเสนอแนะ

ผลการทดลองพบว่ามีการทดลองยังต้องทำการทดลองซ้ำ โดยการเพิ่มจำนวนสัตว์ทดลอง (กุ่ม) เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่มีค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการคำนวณทางสถิติ และยังไม่สามารถทำการทดลองที่ต้องใช้สัตว์ทดลองเพิ่มเติม ในช่วงการทำโปรเจกต์ เพราะมีการปรับปรุงบริเวณเลี้ยงสัตว์ทดลอง แต่จากผลการทดลองที่ได้แสดงข้างต้น สามารถสรุปแนวโน้มบทบาทของ ATG14 ในกุ่มที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว ซึ่งเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการทำงานวิจัยต่อไปได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- ทัศนีย์ นลวชัย. 2555. ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม. จุลสารข่าว. 1: 2
- Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology*, 221(1), 3-12.
- Sun, Q., Fan, W., Chen, K., Ding, X., Chen, S., & Zhong, Q. (2008). Identification of Barkor as a mammalian autophagy-specific factor for Beclin 1 and class III phosphatidylinositol 3-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(49), 19211-19216.
- Zhu, M., Zhan, M., Xi, C., Gong, J., & Shen, H. (2022). Molecular characterization and expression of the autophagy-related gene Atg14 in WSSV-infected *Procambarus clarkii*. *Fish & Shellfish Immunology*, 125, 200-211.
- Söderhäll, K. and Cerenius, L. (1992) Crustacean Immunity. *Annual Review of Fish Diseases*, 2, 3-23.
- Tassanakajon, A., Rimphanitchayakit, V., Visetnan, S., Amparyup, P., Somboonwivat, K., Charoensapsri, W., & Tang, S. (2018). Shrimp humoral responses against pathogens: antimicrobial peptides and melanization. *Developmental & Comparative Immunology*, 80, 81-93.
- Nunan, L. M., & Lightner, D. V. (1997). Development of a non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV). *Journal of virological methods*, 63(1-2), 193-201.
- Poulos, B. T., Pantoja, C. R., Bradley-Dunlop, D., Aguilar, J., & Lightner, D. V. (2001). Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. *Diseases of aquatic organisms*, 47(1), 13-23.
- Chou, H., Huang, C., Wang, C., Chiang, H., & Lo, C. (1995). Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Diseases of aquatic organisms*, 23(3), 165-173.
- Lightner, D. V. (1996). *A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp*.
- Yu, L., Chen, Y., & Tooze, S. A. (2018). Autophagy pathway: cellular and molecular mechanisms. *Autophagy*, 14(2), 207-215.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hansen, M., Rubinsztein, D. C., & Walker, D. W. (2018). Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nature reviews Molecular cell biology*, 19(9), 579-593.

Shi, C. S., & Kehrl, J. H. (2008). MyD88 and Trif target Beclin 1 to trigger autophagy in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 283(48), 33175-33182.

Deretic, V. (2009). Multiple regulatory and effector roles of autophagy in immunity. *Current opinion in immunology*, 21(1), 53-62.

Kirkegaard, K. (2009). Subversion of the cellular autophagy pathway by viruses. *Autophagy in Infection and Immunity*, 323-333.

Taylor, M. P., & Kirkegaard, K. (2008). Potential subversion of autophagosomal pathway by picornaviruses. *Autophagy*, 4(3), 286-289.

Wong, J., Zhang, J., Si, X., Gao, G., Mao, I., McManus, B. M., & Luo, H. (2008). Autophagosome supports coxsackievirus B3 replication in host cells. *Journal of virology*, 82(18), 9143-9153.

Reggiori, F., Monastyrska, I., Verheije, M. H., Cali, T., Ulasli, M., Bianchi, S., ... & Molinari, M. (2010). Coronaviruses Hijack the LC3-I-positive EDEMosomes, ER-derived vesicles exporting short-lived ERAD regulators, for replication. *Cell host & microbe*, 7(6), 500-508.

Taylor, M. P., & Kirkegaard, K. (2007). Modification of cellular autophagy protein LC3 by poliovirus. *Journal of virology*, 81(22), 12543-12553.

Sun, S., Wu, Y., Fu, H., Ge, X., You, H., & Wu, X. (2019). Identification and characterization of four autophagy-related genes that are expressed in response to hypoxia in the brain of the oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*). *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8), 1856.

Deretic, V., & Levine, B. (2018). Autophagy balances inflammation in innate immunity. *Autophagy*, 14(2), 243-251.

Blommaert, E. F., Luiken, J. J., Blommaert, P. J., van Woerkom, G. M., & Meijer, A. J. (1995). Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes (*). *Journal of Biological Chemistry*, 270(5), 2320-2326.

Wu, W., Lin, X., Wang, C., Ke, J., Wang, L., & Liu, H. (2019). Transcriptome of white shrimp *Litopenaeus vannamei* induced with rapamycin reveals the role of autophagy in shrimp immunity. *Fish & shellfish immunology*, 86, 1009-1018.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zhu, M., Zhan, M., Xi, C., Gong, J., & Shen, H. (2022). Molecular characterization and expression of the autophagy-related gene Atg14 in WSSV-infected *Procambarus clarkii*. *Fish & Shellfish Immunology*, 125, 200-211.

Matsunaga, K., Saitoh, T., Tabata, K., Omori, H., Satoh, T., Kurotori, N., ... & Yoshimori, T. (2009). Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nature cell biology*, 11(4), 385-396.

Itakura, E., Kishi, C., Inoue, K., & Mizushima, N. (2008). Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Molecular biology of the cell*, 19(12), 5360-5372.

Sun, Q., Fan, W., Chen, K., Ding, X., Chen, S., & Zhong, Q. (2008). Identification of Barkor as a mammalian autophagy-specific factor for Beclin 1 and class III phosphatidylinositol 3-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(49), 19211-19216.

Fan, W., Nassiri, A., & Zhong, Q. (2011). Autophagosome targeting and membrane curvature sensing by Barkor/Atg14 (L). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(19), 7769-7774.

Jinek, M., & Doudna, J. A. (2009). A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *nature*, 457(7228), 405-412.

Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., & Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818), 363-366.

Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., & Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404(6775), 293-296.

Hutvagner, G., & Simard, M. J. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(1), 22-32.

Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Lührmann, R., & Tuschl, T. (2002). Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*, 110(5), 563-574.

Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Haley, B., & Zamore, P. D. (2002). Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. *Molecular cell*, 10(3), 537-548.

Elbashir, S. M., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21-and 22-nucleotide RNAs. *Genes & development*, 15(2), 188-200.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *The EMBO journal*, 20(23), 6877-6888.

Liu, J., Carmell, M. A., Rivas, F. V., Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J. J., ... & Hannon, G. J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, 305(5689), 1437-1441.

Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., ... & Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), 415-419.

Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*, 116(2), 281-297.

Pillai, R. S., Bhattacharyya, S. N., & Filipowicz, W. (2007). Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms. *Trends in cell biology*, 17(3), 118-126.

Mathonnet, G., Fabian, M. R., Svitkin, Y. V., Parsyan, A., Huck, L., Murata, T., ... & Sonenberg, N. (2007). MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science*, 317(5845), 1764-1767.

Mendoza-Cano, F., & Sánchez-Paz, A. (2013). Development and validation of a quantitative real-time polymerase chain assay for universal detection of the White Spot Syndrome Virus in marine crustaceans. *Virology Journal*, 10(1), 1-11.

Xie, X., Li, H., Xu, L., & Yang, F. (2005). A simple and efficient method for purification of intact white spot syndrome virus (WSSV) viral particles. *Virus Research*, 108(1-2), 63-67.

Jaree, P., Boonchuen, P., Thawonsuwan, J., Kondo, H., Hirono, I., & Somboonwiwat, K. (2022). Transcriptome profiling reveals the novel immunometabolism-related genes against WSSV infection from *Fenneropenaeus merguensis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 120, 31-44.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1. Elution Buffer

Stock	Final concentration
10x PBS	1X
1M Tris pH8.0	50 mM
Reduced Glutathione	30 mM

2. 70 % Ethanol

เตรียมได้จากเอทานอลความเข้มข้น 95% โดยการเตรียมเอทานอลความเข้มข้น 70% ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ให้คำนวณดังนี้

จากสูตร

$$\begin{aligned}
 C_1V_1 &= C_2V_2 \\
 95\% \times V_1 &= 70\% \times 1,000 \text{ มิลลิลิตร} \\
 V_1 &= 736.842 \text{ มิลลิลิตร} \\
 &\approx 737 \text{ มิลลิลิตร}
 \end{aligned}$$

วิธีการเตรียม

ผสมเอทานอลความเข้มข้น 95% ปริมาตร 737 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่นปริมาตร 263 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน

10x TBE buffer

Tris Base	108	กรัม
Boric acid	55.0	กรัม
Double-distilled H ₂ O	900	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA pH8.0	40.0	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



งานบัณฑิตศึกษาคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ 20 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2565

ข้าพเจ้า นางสาววราลี ตาลอุทัย รหัสประจำตัว 62050647

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชา ชีววิทยา

ขอรับรองว่าสหกิจศึกษา เรื่อง

ชื่อภาษาไทย การศึกษาบทบาทของยีน ATG14 ในกิ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว

ชื่อภาษาอังกฤษ The role of ATG14 in *Penaeus vannamei* upon WSSV infection

ปีการศึกษา 2565

เป็นผลงานวิจัยของข้าพเจ้าแต่เพียงผู้เดียวโดยมิได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนโดยใช้โปรแกรมเรียบร้อยแล้วและได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากวิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์แล้วโปรแกรมอักขรวิสุทธิ 6.17 %

ลงชื่อ.....**วราลี ตาลอุทัย**.....

(นางสาววราลี ตาลอุทัย)

นักศึกษา

ข้าพเจ้า ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ อาจารย์ที่ปรึกษาสหกิจศึกษาได้ตรวจสอบสหกิจศึกษาของนักศึกษาข้างต้นแล้วขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ.....**Khunyingkan Klambit**.....

(ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์)

อาจารย์ที่ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



SUBMITTED BY	ORGANIZATION	FILENAME	STATUS	SIMILARITY INDEX
62050647@kmitl.ac.th	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง	การศึกษามหาทอมอิน ATG14 ในห้องที่ ดัดโรยตัวแดงของขาว.docx	Completed	6.17 %

Submission Information

SUBMISSION DATE	ID
Dec 20, 2022 at 16:13 PM	2885780

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้