

การศึกษาบทบาทของยีน *STX16* ในกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว

The role of *STX16* in *Penaeus vannamei* upon
WSSV infection



พิชชากร หมดประเสริฐ 62050628

สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร

บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2565

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The role of *STX16* in *Penaeus vannamei* upon
WSSV infection

PICHAKORN MADPRASERT 62050628

A COOPERATIVE EDUCATION SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ACADEMIC YEAR 2022

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อสหกิจศึกษา	การศึกษาบทบาทของยีน STX16 ในกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว The role of STX16 in <i>Penaeus vannamei</i> upon WSSV infection
ชื่อนักศึกษา	นางสาว พิชชากร หมัดประเสริฐ รหัสนักศึกษา 62050628
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ (สจล.)
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.ภัทธันดา จารีย์ (สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล)

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2565

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.วิภาวี เดชดีศักดิ์ ประธานกรรมการ	
ดร.ภัทธันดา จารีย์ กรรมการ	Digitally signed by phattarunda.jar Date: 2023.01.07 20:32:21 +07'00'
ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หนังสือแสดงเจตจำนงว่าด้วยการเผยแพร่ผลงาน

ข้าพเจ้า..... ดร.ภัทธันดา จารีย์..... ตำแหน่ง..... นักวิจัย.....

บริษัท..... ศูนย์วิจัยประยุกต์และพัฒนานวัตกรรมกึ่ง สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล.....

ตั้งอยู่ที่..... 25/25 ถนนพุทธมณฑลสาย 4 ต.ศาลายา พุทธมณฑล นครปฐม 73170.....

ได้รับนักศึกษา ชื่อ..... พิษขวกร หมดประเสริฐ..... รหัสนักศึกษา..... 62050628..... ของ

สาขาวิชา..... จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม..... ภาควิชา..... ชีววิทยา..... คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เข้าร่วมร่วมโครงการสหกิจศึกษา 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
phattarundajar
Date: 2023.01.06
18:54:40 +07'00'

(ลงชื่อ)..... ผู้แสดงเจตจำนง

(.....ดร.ภัทธันดา จารีย์.....)

(ลงชื่อ)..... ผู้แทนภาควิชา/คณะ

(.....ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุญ.....)

(ลงชื่อ)..... พยาน

(..... ผศ.ดร.วิภาวี เชตติศักดิ์.....)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อสหกิจศึกษา	การศึกษาบทบาทของยีน <i>STX16</i> ในกึ่งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว
ชื่อนักศึกษา	นางสาว พิชชากร หมัดประเสริฐ รหัสนักศึกษา 62050628
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ (สจล.)
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.ภัทรันดา จารีย์ (สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล)

บทคัดย่อ

ปัจจุบันผลผลิตกึ่งของประเทศไทยมีแนวโน้มลดลงอย่างมาก ซึ่งมีผลมาจากการระบาดของโรคกึ่ง ทั้งโรคอุบัติใหม่และโรคระบาดซ้ำ หนึ่งในนั้นคือโรคตัวแดงดวงขาว ที่ผ่านมามีการค้นคว้าแนวทางยับยั้งการระบาดของโรคนี้ในกึ่งแต่ยังพบการระบาดซ้ำ คณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาระบบภูมิคุ้มกันใหม่ที่ไม่มีการศึกษามาก่อน เพื่อนำมาใช้เป็นแนวทางยับยั้งการระบาดของโรค คือ กระบวนการออโตฟาจี (autophagy) ซึ่งเป็นกระบวนการกินตัวเองของเซลล์ ในกระบวนการนี้มีโปรตีนเกี่ยวข้องมากมาย หนึ่งในนั้นคือ Syntaxin16 (*STX16*) มีรายงานว่าโปรตีนดังกล่าวมีบทบาทสำคัญในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่เซลล์ ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงสนใจศึกษาบทบาทของยีน *STX16* ในกึ่งที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยเริ่มจากการค้นหาและวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมของ *STX16* ของกึ่งขาว จากการทำนายด้วยโปรแกรม SMART พบว่ามี 3 conserve domains เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *STX16* พบว่าแสดงออกมากที่สุดในเหงือก และแสดงออกเพิ่มขึ้นหลังติดไวรัสตัวแดงดวงขาว จึงคาดว่าแสดงออกที่เปลี่ยนไปของยีน *STX16* เกี่ยวข้องกับการติดไวรัสตัวแดงดวงขาว จึงทำการศึกษารoles บทบาทของยีน *STX16* ในกึ่งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาวด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi) โดยเริ่มจากการสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับยีน *STX16* (*dsSTX16*) เมื่อฉีด *dsSTX16* ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อกรัมกึ่ง สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *STX16* ในกึ่งได้ และพบว่าที่ 24 30 และ 48 ชั่วโมง ยีน *VP28* ของไวรัสตัวแดงดวงขาวมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณของไวรัสที่เวลาเดียวกันเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อติดตามอัตราการตายสะสมของกึ่ง พบว่าเมื่อยีน *STX16* ลดลง หลังจากติดโรคตัวแดงดวงขาวมีอัตราการตายสะสม 100% ภายใน 6 วัน ซึ่งเร็วกว่ากลุ่มควบคุม จากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า ระดับการแสดงออกของยีน *STX16* มีผลต่อการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่ง โดย *STX16* อาจมีส่วนในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่ง ซึ่งข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถทำการศึกษาต่อยอด เพื่อนำไปพัฒนาเพื่อใช้ในการแก้ไขปัญหาการระบาดของโรคตัวแดงดวงขาวในอุตสาหกรรมกึ่งต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
คำสำคัญ : กระบวนการออโตฟาจี, *STX16*, โรคตัวแดงดวงขาว, กึ่งขาว, อาร์เอ็นเอ

Title	The role of STX16 in <i>Penaeus vannamei</i> upon WSSV infection
Students	Miss Pichakorn Madprasert Student ID 62050628
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 (KMITL)
Co-advisor	Dr.Phattarunda Jaree (MB)

Abstract

Presently, shrimp production tends to dramatically decrease which is a result of shrimp diseases, both emerging and re-emerging infectious diseases. One of those is white spot disease. It has been investigated controlling strategies but this disease still spread. To solve this problem, the new viral immune system is interesting which is Autophagy, a process of cellular eating. Many proteins are involved in this process including Syntaxin16 (STX16). It had been reported that STX16 mediates the removal of invaders. This study aims to investigate the function of *STX16* in white spot syndrome virus (WSSV) infected shrimp. By SMART software prediction, STX16 protein contained 3 conserved domains. The highest expression of *STX16* was in gill tissue and it was upregulated after WSSV infection. These results suggest that changes in *STX16* expression are caused by WSSV infection. The functional study of *STX16* in shrimp was studied by using RNA interference (RNAi). The double-stranded RNA targeting *STX16* (dsSTX16) was produced. Injection of dsSTX16 of the dose 1 µg/g shrimp could suppress *STX16* expression, resulting in an upregulation of viral VP28 mRNA expression and viral copy number at 24, 30 and 48 hours post injection. Moreover, cumulative mortality of shrimp showed that reduction of *STX16* after WSSV infection led to 100% mortality within 6 days when compared with the control group. It is concluded that the expression level of *STX16* affects WSSV infection in shrimp and *STX16* may involve in the inhibition of viral replication. This knowledge may apply to study in the development of controlling white spot disease in the shrimp industry.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ลงวันแล้ว สำหรับการเขียนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำหรือเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
 ไม่ว่ากรณใดๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นแต่กรณีที่มีเหตุอันสมควรและต้องขออนุญาตจากเจ้าของลิขสิทธิ์ที่มีการนำไปใช้

Keywords: Autophagy, STX16, white spot disease, *P. vannamei*, RNAi



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยการศึกษาบทบาทของยีน *STX16* ในกิ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาวสำเร็จลุล่วงได้ด้วย ความกรุณาอย่างยิ่งจากอาจารย์ที่ปรึกษา ดร.ภัทรันดา จารีย์ รวมถึงบุคลากรของศูนย์วิจัยประยุกต์และพัฒนานวัตกรรมกิ้งในสถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้เสียสละเวลาอันมีค่าในการให้คำปรึกษา คำแนะนำ เสนอแนวคิด ให้ความรู้อันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้ และใส่ใจทุกขั้นตอนการทำงานของงานวิจัยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ เพื่อให้งานวิจัยนี้ สมบูรณ์ และทำให้ผู้วิจัยได้รับประสบการณ์ในการทำงานวิจัย ถ่ายทอดความรู้ให้แก่ผู้วิจัย คอยให้กำลังใจ งานวิจัยสำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้ง และขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการ C204 และอาคารสัตว์ทดลอง สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล เนื่องจากเป็นสถานที่ในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณดร.คณิงกานต์ กลั่นบุญศุภ อาจารย์ที่ปรึกษาสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้คำแนะนำ และคำปรึกษาในการเตรียมตัวในการฝึกปฏิบัติสหกิจศึกษา และให้คำปรึกษาเกี่ยวกับงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และเพื่อนๆ ทุกคนที่คอยให้กำลังใจ ให้คำปรึกษา และให้ความช่วยเหลือทุกอย่างด้วยดีเสมอมา หากมีสิ่งใดบกพร่องผู้วิจัยขอน้อมรับไว้ และขอภัยไว้ ณ โอกาสนี้

พิชชากร หมดประเสริฐ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ง
สารบัญ.....	จ
สารบัญตาราง.....	จ
สารบัญรูป.....	ฉ
คำย่อ/สัญลักษณ์ (ถ้ามี).....	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	1
1.3 ขอบเขต.....	1
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ระบบภูมิคุ้มกัน.....	3
2.1.1 ภูมิคุ้มกันแบบอาศัยเซลล์ (Cellular Response).....	3
2.1.2 ภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (Humoral Response).....	3
2.2 ไวรัสตัวแดงดวงขาว.....	4
2.3 กระบวนการออโตฟาจี.....	4
2.4 กระบวนการออโตฟาจีกับไวรัส.....	5
2.5 กระบวนการออโตฟาจีในกิ้ง.....	6
2.6 STX16 ในกระบวนการออโตฟาจี.....	7
2.7 กระบวนการ RNA interference.....	8
2.7.1 short interference RNA (siRNA).....	8
2.7.2 Micro RNA (miRNA).....	9
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	10
3.1 การวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมของยีน <i>STX16</i>	10
3.1.1 การสืบค้นข้อมูล.....	10
3.1.2 การหา Conserve domain.....	10
3.1.3 การสร้าง phylogenetic tree.....	10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้ในการเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>STX16</i> ในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ.....	11
3.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>STX16</i> ในกึ่งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว.....	12
3.3.1 การเตรียมบ่อสำหรับเลี้ยงตัวอย่างกึ่ง และการเก็บตัวอย่างกึ่งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว.....	12
3.3.2 การสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างกึ่ง.....	12
3.3.3 การสร้าง first – stranded cDNA	13
3.3.4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>STX16</i>	14
3.4 การสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับยีน <i>STX16</i>	14
3.4.1 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (PCR amplification)	15
3.4.2 การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis และการวัดความเข้มข้นด้วย nanodrop spectrophotometer	15
3.4.3 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ (PCR purification)	16
3.4.4 การ ligation	17
3.4.5 การ Transformation	17
3.4.6 ทำการคัดเลือก positive control ด้วยเทคนิค colony PCR.....	18
3.4.7 Plasmid extraction โดย Presto™ Mini Plasmid Kit (Geneaid).....	19
3.4.8 ทำการคัดเลือก positive clone ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	20
3.4.9 การเพิ่มจำนวน DNA แม่แบบ สำหรับการนำไปผลิต dsRNA	20
3.4.10 การสร้าง dsRNA ที่จำเพาะกับยีน <i>STX16</i> (ds <i>STX16</i>).....	21
3.5 การตรวจสอบประสิทธิภาพของ ds <i>STX16</i> ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน <i>STX16</i> ในกึ่ง.....	22
3.6 การศึกษาบทบาทของยีน <i>STX16</i> ในกึ่งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว.....	23
3.6.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>STX16</i> และยีนไวรัส <i>VP28</i> ในกึ่ง.....	23
3.6.2 การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis และการวัดความเข้มข้นด้วย nanodrop spectrophotometer	23
3.6.3 ตรวจสอบปริมาณไวรัส (WSSV copy number) ของไวรัสตัวแดงดวงขาว..	23
3.6.3.1 สกัด genomic DNA.....	23
3.6.3.2 quantitative PCR.....	24
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	26
4.1 การวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรม.....	26

4.1.1 ค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์..... 26

4.1.2 หา conserve domain..... 27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการเรียนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นกรณีไม่มีเหตุแบบสงวนลิขสิทธิ์และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	หน้า
4.1.3 การสร้าง phylogenetic tree	27
4.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>STX16</i> ในเนื้อเยื่อกุ้งปกติ	28
4.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>STX16</i> ในกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว	29
4.4 การสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับยีน <i>STX16</i>	30
4.4.1 การเพิ่มจำนวนยีน <i>STX16</i> ด้วยเทคนิค PCR (PCR amplification)	30
4.4.2 การทำขี้นยีน <i>STX16</i> ให้บริสุทธิ์ (Purification of PCR product)	31
4.4.3 การคัดเลือกโคลนด้วยเทคนิค Blue-white screening.....	31
4.4.4 การคัดเลือกโคลนด้วยเทคนิค colony PCR.....	32
4.4.5 การคัดเลือกโคลนโดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) <i>EcoRI</i>	32
4.4.6 การเพิ่มจำนวนยีน <i>STX16</i> และต่อ T7 promoter ด้วยเทคนิค PCR (PCR amplification).....	33
4.4.7 การทำขี้นยีน <i>STX16</i> ที่มีส่วนของ T7 promoter ให้บริสุทธิ์ (purification of PCR product).....	34
4.4.8 การสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับยีน <i>STX16</i> หรือ ds <i>STX16</i>	35
4.5 การตรวจสอบประสิทธิภาพของ ds <i>STX16</i> ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน <i>STX16</i> ในกุ้ง.....	36
4.6 การศึกษาบทบาทของยีน <i>STX16</i> ในกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว.....	36
4.6.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>STX16</i> และยีนไวรัส <i>VP28</i>	36
4.6.2 การติดตามอัตราการตายของกุ้ง.....	40
4.6.3 การตรวจสอบปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV copies number)	40
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	42
5.1 สรุปผลการทดลอง	42
5.2 ข้อเสนอแนะ	43
เอกสารอ้างอิง.....	44
ภาคผนวก	47
ภาคผนวก ก	48
ภาคผนวก ข.....	49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 แสดงส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา qPCR (PCR reaction).....	11
3.2 แสดงอุณหภูมิและระยะเวลาในการทำ qPCR และขั้นตอน (PCR reaction).....	11
3.3 แสดงส่วนประกอบจากชุด RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Themoscientific) ของสารที่ใช้ในการสร้าง cDNA.....	13
3.4 แสดงส่วนประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR.....	15
3.5 แสดงขั้นตอนการทำ PCR (PCR amplification).....	15
3.6 แสดงส่วนประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการทำ ligation.....	17
3.7 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ LB.....	18
3.8 แสดงส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (selective media) สำหรับการคัดเลือกแบบ blue-white screening.....	18
3.9 แสดงส่วนประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR.....	19
3.10 แสดงขั้นตอนการทำ PCR (PCR amplification).....	19
3.11 แสดงส่วนประกอบของสารที่ใช้ในการ cut check ด้วย restriction enzyme <i>EcoRI</i> ..	20
3.12 แสดงส่วนประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR.....	21
3.13 แสดงขั้นตอนการทำ PCR (PCR amplification).....	21
3.14 แสดงส่วนประกอบของสารที่ใช้ในการสร้าง dsRNA ด้วยชุด T7 Ribormax™ Express Large Scale RNA production system (Promega).....	22
3.15 แสดงส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา qPCR (PCR reaction).....	24
3.16 แสดงส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา qPCR (PCR reaction).....	25
4.1 ผลการวัดความเข้มข้น purified PCR product ด้วย nanodrop spectrophotometer.....	31
4.2 ผลการวัดความเข้มข้นของพลาสมิดด้วย nanodrop spectrophotometer.....	33
4.3 ผลการวัดความเข้มข้น purified PCR Product ของชิ้นยีน <i>STX16</i> ที่ต่อด้วย T7 promoter ด้วย nanodrop spectrophotometer.....	35
4.4 แสดงผลการวัดความเข้มข้น dsSTX16 ด้วย nanodrop spectrophotometer.....	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 แสดงการเปรียบเทียบระหว่างกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาวและกุ้งปกติ.....	4
2.2 แสดงกระบวนการและกลไกควบคุมหลักของอโตฟาจี.....	5
2.3 แสดงบทบาทของยีน <i>STX16</i> ในกระบวนการอโตฟาจี.....	7
2.4 แสดงกลไกการทำงานของ siRNA และ miRNA.....	8
3.1 pGEM®-T Easy Vector (promega).....	17
4.1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ <i>STX16</i> ของกุ้งขาว <i>Penaeus vannamei</i>	26
4.2 แสดงข้อมูลเกี่ยวกับ conserve domain ของโปรตีน <i>STX16</i>	27
4.3 แสดงแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของโปรตีน <i>STX16</i>	28
4.4 แสดงผลการแสดงออกของยีน <i>STX16</i> ที่พบในเนื้อเยื่อกุ้ง.....	29
4.5 การแสดงออกของยีน <i>STX16</i> เมื่อกุ้งติดไวรัสตัวแดงดวงขาว.....	30
4.6 แสดงผลการตรวจสอบคุณภาพของ PCR product ของยีน <i>STX16</i> ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis.....	30
4.7 แสดงผลการตรวจสอบคุณภาพของ purified PCR product ของยีน <i>STX16</i> ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis.....	31
4.8 แสดงผลการคัดเลือกโคลนด้วยเทคนิค Blue-white screening.....	31
4.9 แสดงผลการคัดเลือกโคลนจากการทำ Colony PCR แสดงการตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis.....	32
4.10 แสดงผลการตรวจสอบการคัดเลือกโคลน ด้วยการใช้ <i>EcoRI</i> ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis.....	32
4.11 แสดงผลการตรวจสอบ PCR Product ของยีน <i>STX16</i> ที่มีส่วนของ T7 promoter ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis.....	33
4.12 แสดงผลการตรวจสอบชิ้นยีน Purified <i>STX16</i> -T7F/R และ <i>STX16</i> -F/ T7R ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis.....	34
4.13 แสดงผลการตรวจสอบ ds <i>STX16</i> ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis.....	35
4.14 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>STX16</i> ในกุ้งเมื่อถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน <i>STX16</i> ด้วย ds <i>STX16</i>	36
4.15 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>STX16</i> ในเหงือกกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว	37
4.16 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>VP28</i> ในเหงือกของกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว.....	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่สามารถนำข้อมูลนี้ไปใช้ในเชิงพาณิชย์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่	หน้า
4.18 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน VP28 ในเหงือกของกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว.....	39
4.19 แสดงผลอัตราการอยู่รอดของกุ้งที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาว.....	40
4.20 แสดงผลการตรวจสอบปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV copies number) ในกุ้งหลังติดโรคตัวแดงดวงขาว.....	41



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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
STX	Syntaxin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สัตว์ทะเลที่มีความสำคัญและเป็นที่ยอมรับทั้งในประเทศไทย และต่างประเทศนั้นก็คือ กุ้ง โดย กุ้งเป็นสัตว์น้ำที่สร้างรายได้จากการส่งออกสินค้าเป็นอย่างมาก แต่ในปัจจุบันอุตสาหกรรมกุ้งในประเทศไทยและต่างประเทศ ได้ประสบปัญหาผลผลิตกุ้งลดลงเมื่อเทียบกับหลาย ๆ ปีก่อนหน้า ซึ่งมีผลมาจากโรคระบาดในกุ้ง ทั้งโรคที่อุบัติใหม่ และโรคที่ระบาดซ้ำเดิม โดยหนึ่งในนั้นคือ โรคตัวแดงดวงขาว เป็นหนึ่งในสาเหตุที่ทำให้อุตสาหกรรมกุ้งในหลาย ๆ ประเทศเกิดความเสียหาย และเนื่องจากปัญหาการระบาดของโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้ง ยังไม่สามารถที่จะแก้ไขได้ด้วยองค์ความรู้ในปัจจุบัน การศึกษาในครั้งนี้จึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษาองค์ความรู้ใหม่ นั่นคือความสามารถของกระบวนการออโตฟาจีในการป้องกันหรือยับยั้งการติดโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้ง

กระบวนการออโตฟาจี คือกระบวนการการกินตัวเองของเซลล์ โดยปกติแล้วจะถูกกระตุ้นจากการเกิดความเครียดของเซลล์ หรืออยู่ในสภาวะขาดสารอาหาร โดยจะเป็นกระบวนการที่เซลล์ใช้กำจัดองค์ประกอบของเซลล์ที่เสื่อมสภาพหรือสิ่งแปลกปลอม เพื่อป้องกันการดำเนินงานที่ผิดปกติของเซลล์ ซึ่งสามารถก่อให้เกิดโรคได้ และยังมีรายงานว่ากระบวนการออโตฟาจี มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเมื่อเซลล์ติดไวรัสจากรายงานผลวิจัยที่ผ่านมาพบว่า Syntaxin16 (STX16) เป็นยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการออโตฟาจี โดยจะมีบทบาทในการเหนี่ยวนำโปรตีนหรือองค์ประกอบที่เสื่อมสภาพเข้ามาภายในฟาโกโซม (Phagosome) จากนั้นเมื่อเกิดการสร้างออโตฟาโกโซม (Autophagosome) ก็พบว่า STX16 ยังมีส่วนช่วยให้ไลโซโซม (Lysosome) เข้ามาใกล้กับออโตฟาโกโซมอีกด้วย ปัจจุบันมีรายงานข้อมูลของ STX16 น้อยมาก และยังไม่มีการศึกษาในกุ้งมาก่อน ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้ จึงสนใจศึกษาบทบาทของยีน *STX16* ในกุ้งขาวที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาว ทำให้ได้องค์ความรู้ใหม่ ที่อาจจะสามารถนำมาพัฒนาและประยุกต์ใช้ เพื่อแก้ไขปัญหาการระบาดของไวรัสตัวแดงดวงขาวในอุตสาหกรรมกุ้งได้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาบทบาทของยีน *STX16* ในกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. ค้นหา และวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมของ *STX16* ของกุ้งขาว

เอกสารนี้เป็น 2. กลศึกษาการแสดงออกของยีน *STX16* ในเนื้อเยื่อกุ้ง และในกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาวด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ที่ศึกษาบทบาทของ *STX16* ในกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาวด้วยเทคนิค RNA interference ใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

องค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาบทบาทของยีน *STX16* ในกิ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว สามารถทำการศึกษาต่อยอด เพื่อนำไปพัฒนาใช้ในการแก้ปัญหาการระบาดของโรคตัวแดงดวงขาวในอุตสาหกรรมกิ้งต่อไปได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ระบบภูมิคุ้มกันของกิ้ง

กิ้งเป็นสัตว์ทะเลที่มีระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (innate immunity) โดยธรรมชาติ ซึ่งมีกลไกการป้องกันตัวเองจากสิ่งแปลกปลอม สามารถแบ่งได้เป็น กลไกการป้องกันตนเองโดยโครงสร้างภายนอก และกลไกการป้องกันตนเองภายในร่างกาย (Raico et al., 2003) โดยกลไกการป้องกันตนเองภายในร่างกายนั้นจะมีการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมอยู่ด้วยกัน 2 ระบบคือ

2.2.1 ภูมิคุ้มกันแบบอาศัยเซลล์ (Cellular Response)

กระบวนการฟาโกไซโตซิส (Phagocytosis) และ กระบวนการอะพอพโทซิส (Apoptosis) มีรายงานว่ามียาพิษสำคัญในการตอบสนองการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของกิ้ง (Wang and Zhang, 2008) โดยฟาโกไซโตซิสจะอาศัยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือด ในการทำลายสิ่งแปลกปลอมซึ่งจะกระจายอยู่ทั่วไปตามเนื้อเยื่อภายในกระแสเลือด ต่อม้ำเหลือง (lymphoid organ) ตับและตับอ่อน (hepatopancreas) และอวัยวะอื่น ๆ นอกจากนี้ระบบภูมิคุ้มกันแบบอาศัยเซลล์ยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดใหญ่หรือกระบวนการ Encapsulation อีกด้วย (Soderhall and Cerenius, 1992)

2.2.2 ภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (Humoral Response)

โดยระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดนั้นจะมียาพิษที่สำคัญเช่นกระบวนการสร้างสารเมลานิน (Melanization) และกระบวนการแข็งตัวของเลือด (Blood clotting) เป็นต้น โดยพบว่ามีการทำงานร่วมกันกับระบบภูมิคุ้มกันแบบอาศัยเซลล์โดยจะเป็นการทำงานของโปรตีนต่างๆที่อยู่ในน้ำเลือด โดยเซลล์เม็ดเลือดของกิ้งจะมีการผลิตสารโปรตีนที่ทำหน้าที่ ช่วยจับ และเข้าจับกับโมเลกุลสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรค ซึ่งเรียกว่า pattern recognition protein (PRPs) โดยจะทำการส่งต่อสัญญาณเป็นทอด ๆ ผ่าน signaling pathway เพื่อกระตุ้นให้เกิดการผลิตสารต้านจุลชีพ (Antimicrobial peptide) หรือสารที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมนั้น ๆ (Tassanakajon et al., 2017)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ไวรัสตัวแดงดวงขาว

โรคตัวแดงดวงขาว (White Spot Disease; WSD) เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (White Spot Syndrome Virus; WSSV) ซึ่งส่งผลกระทบต่อสัตว์ทะเลที่ถูกเลี้ยงในเชิงพาณิชย์ โดยส่วนใหญ่มักเป็นสัตว์จำพวกกุ้ง ปัญหาของโรคตัวแดงดวงขาวนั้นไม่เพียงแต่จะเกิดแค่ในเอเชีย แต่ถือเป็นปัญหาที่เกิดขึ้นทั่วโลก (Chou et al., 1995) ไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นหนึ่งในไวรัสที่ทำให้เกิดความเสียหายกับอุตสาหกรรมกุ้ง โดยกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาวจะมีลักษณะเป็นจุดสีขาว หรือมีลักษณะเป็นดวงสีขาว ที่ผิวหนังนอก โดยมักเกิดที่บริเวณเปลือกส่วนหัวของกุ้ง ในบางครั้งอาจทำให้กุ้งมีลักษณะตัวเป็นสีแดงด้วย นอกจากนี้ยังทำให้กุ้งมีอาการอยากอาหารลดลง ซึ่งสาเหตุนี้ทำให้กุ้งมีอัตราการตาย 100% อยู่ที่ 3-5 วัน (Lightner, 1996)



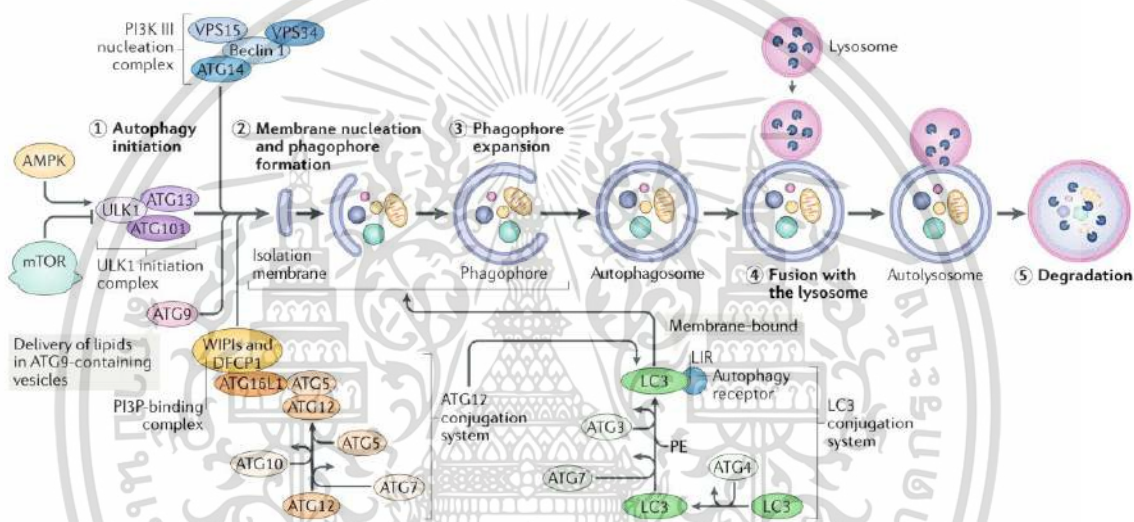
ภาพที่ 2.1 แสดงการเปรียบเทียบระหว่างกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาวและกุ้งปกติ

2.3 กระบวนการออโตฟาจี

โดยกระบวนการออโตฟาจี หรือกระบวนการกินตัวเองของเซลล์ โดยปกติแล้วจะเกิดการกระตุ้นให้เกิดออโตฟาจีจากความเครียดของเซลล์ และสภาวะที่เซลล์เกิดการขาดสารอาหาร ซึ่งจะเกิดการทำลายโปรตีนและองค์ประกอบของเซลล์ที่เสื่อมสภาพ โดยกระบวนการออโตฟาจีนี้จะเริ่มจากการเหนี่ยวนำโปรตีนหรือองค์ประกอบที่เสื่อมสภาพที่ต้องการกำจัด เข้ามาในฟาโกพอร์ (Phagophore) และต่อมาจะมีการสร้างเป็นโครงสร้างที่เรียกว่าออโตฟาโกโซม (Autophagosome) เกิดขึ้น จากนั้นจะเกิดการเหนี่ยวนำไลโซโซม (Lysosome) ให้เข้าจับกับออโตฟาโกโซม และทำให้เกิดการย่อยสลายองค์ประกอบที่เสื่อมสภาพภายในออโตฟาโกโซม (Hansen et al., 2018) กระบวนการออโตฟาจี

แบ่งเป็น 5 ขั้นตอนตามที่แสดงในภาพที่ 2.1 โดยเริ่มจาก Autophagy initiation ซึ่งเป็นกระบวนการเกิดออโตฟาจี เริ่มจากการเติมหมู่ฟอสเฟตเพื่อกระตุ้นการทำงานของกลุ่มโปรตีนเริ่มต้น (Pre-

initiation complex) ต่อมาเป็น Membrane nucleation and phagophore formation ซึ่งเป็นขั้นตอนการสร้างเยื่อหุ้มฟาโกพอร์ (Phagophore formation) โดยจะนำเอาองค์ประกอบของเซลล์ที่เสื่อมสภาพ ออร์แกเนลล์ โปรตีน รวมถึงเชื้อก่อโรคเข้าไปไว้ในเยื่อหุ้มฟาโกพอร์ จากนั้นเป็นขั้น Phagophore expansion โดยเยื่อหุ้มจะเกิดการขยาย และเกิดเป็นโครงสร้างออตฟาโกโซม (Autophagosome) เพื่อกักเก็บโปรตีนหรือองค์ประกอบของเซลล์ที่เสื่อมสภาพเอาไว้ด้านใน ต่อมาเป็นขั้น Fusion with the lysosome โดยออตฟาโกโซมจะเกิดการเหนี่ยวนำให้ไลโซโซม (Lysosome) เข้ามาจับ และเกิดเป็นกระบวนการขั้นสุดท้าย คือ Degradation โดยจะเกิดหลังจากมีการจับกันระหว่างไลโซโซม และ ออตฟาโกโซมจะเกิดการย่อยสลายโปรตีนหรือองค์ประกอบที่เสื่อมสภาพในออตฟาโกโซม (Hansen et al., 2018)



ภาพที่ 2.2 แสดงกระบวนการและกลไกควบคุมหลักของออตฟาจิ (Hansen et al., 2018)

2.4 กระบวนการออตฟาจิกับไวรัส

กระบวนการออตฟาจิ ทำหน้าที่สร้างสมดุลเมตาบอลิซึมของเซลล์ และทำให้เซลล์อยู่รอดในสภาวะเครียด (Mizushima et al., 2008) โดยมีรายงานว่าได้มีการส่งสัญญาณกระตุ้นกระบวนการออตฟาจิ ในระหว่างการติดเชื้อไวรัส โดยทำหน้าที่เป็นกลไกเฝ้าระวังที่ส่งแอนติเจนของไวรัสไปยังไลโซโซมเพื่อกำจัดไวรัส โดยขนส่งส่วนประกอบของไวรัสไปยังเอนโดโซม (endosome) เพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโดยธรรมชาติ (Delgado et al., 2009) นอกจากนี้ยังพบว่าออตฟาโกโซมมีความสามารถในการดักจับ และย่อยสลายเชื้อโรคภายในเซลล์ หรือเรียกว่ากระบวนการ xenophagy ซึ่งเป็นกลไกการต้านไวรัสของกระบวนการออตฟาจิ (Virgin et al., 2009) ในทางกลับกัน พบว่ามีไวรัสบางตัวที่กระตุ้นกระบวนการออตฟาจิ เพื่อช่วยเพิ่มปริมาณไวรัสได้ (Virgin et al., 2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

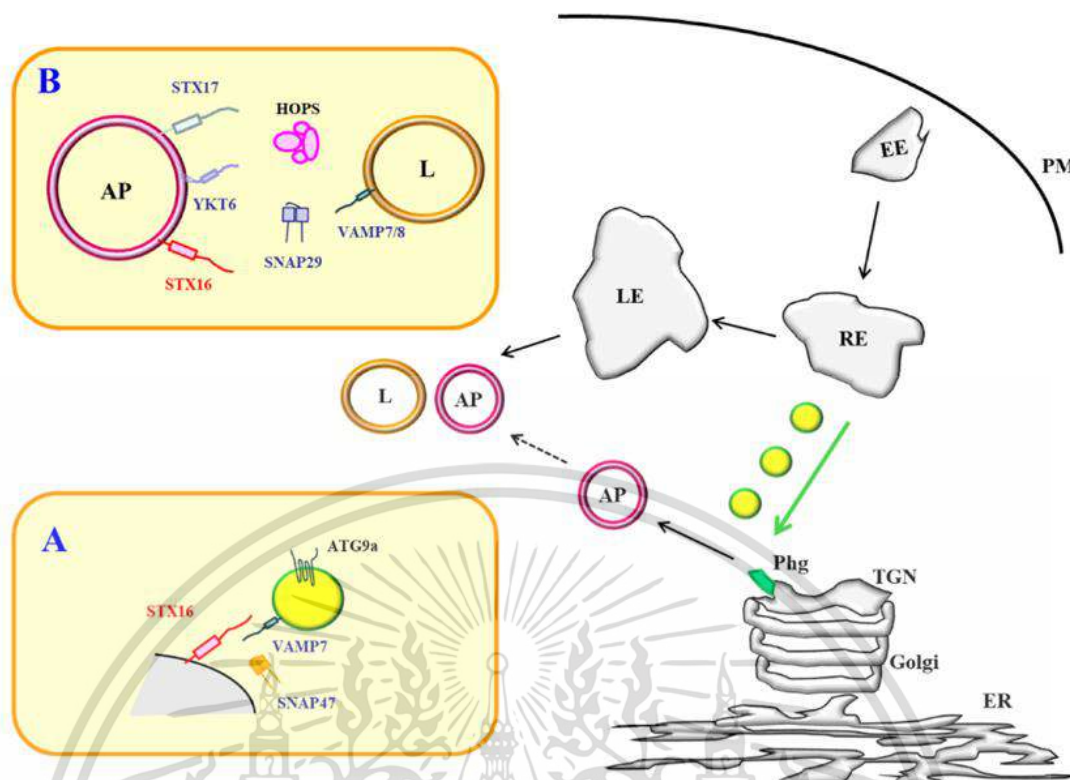
2.5 กระบวนการออโตฟาจีในกุง

กระบวนการออโตฟาจีมีความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสในกุง โดยมีรายงานว่ากระบวนการออโตฟาจี มีบทบาทเชิงบวกกับการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว เนื่องจากการเข้ามาของไวรัสตัวแดงดวงขาวจะเพิ่มขึ้นโดยการเหนี่ยวนำของกระบวนการออโตฟาจี จากการฉีดด้วยราปาไมซิน (rapamycin) ซึ่งบ่งชี้ว่าไวรัสตัวแดงดวงขาว มีแนวโน้มที่จะใช้ประโยชน์จากกระบวนการออโตฟาจีสำหรับการเข้ามาภายในเซลล์ (Chen et al., 2016) แต่ในทางกลับกันกระบวนการออโตฟาจีก็สามารถยับยั้งการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ โดยมีรายงานว่า TRIM50-Like มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ซึ่งใช้กระบวนการออโตฟาจีเข้ามาเกี่ยวข้อง เริ่มจากระบบยีน TRIM50-like จาก *Penaeus monodon* (*PmTRIM50* -like) เพื่อดูบทบาทของยีน จากนั้นได้มีการทดลองยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmTRIM50*-like ในกุงที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาว และได้ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน VP28 ซึ่งเป็นยีนที่พบมากที่สุดภายในไวรัสตัวแดงดวงขาว พบว่าในกุงที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmTRIM50*-like มีการแสดงออกของยีน VP28 เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของกุงที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาว พบว่ากุงกลุ่มที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmTRIM50*-like มีอัตราการรอดชีวิตต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (Zhao et al., 2021) และยังมีรายงานว่าโปรตีนในกลุ่ม autophagy – related genes (ATGs) มีความเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์จำพวกครัสเตเชียน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่ากระบวนการออโตฟาจีมีผลช่วยทำให้เกิดการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ดีขึ้น และทำการยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (Jian et al., 2022)

2.6 STX16 ในกระบวนการออโตฟาจี

จากงานวิจัยที่ผ่านมา มีรายงานว่า STX16 มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างออโตฟาโกโซม ของกระบวนการออโตฟาจี ซึ่งมีส่วนช่วยทำให้เกิดการเหนี่ยวนำให้ ATG9a เข้าจับกับฟาโกพอร์ นอกจากนี้ STX16 ยังมีส่วนช่วยในการเหนี่ยวนำให้ไลโซโซมเข้ามาใกล้กับออโตฟาโกโซม และเกิดการทำลายโปรตีนหรือองค์ประกอบที่เสื่อมสภาพตามรายละเอียดที่แสดงในภาพที่ 2.2 (Tang, 2019)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

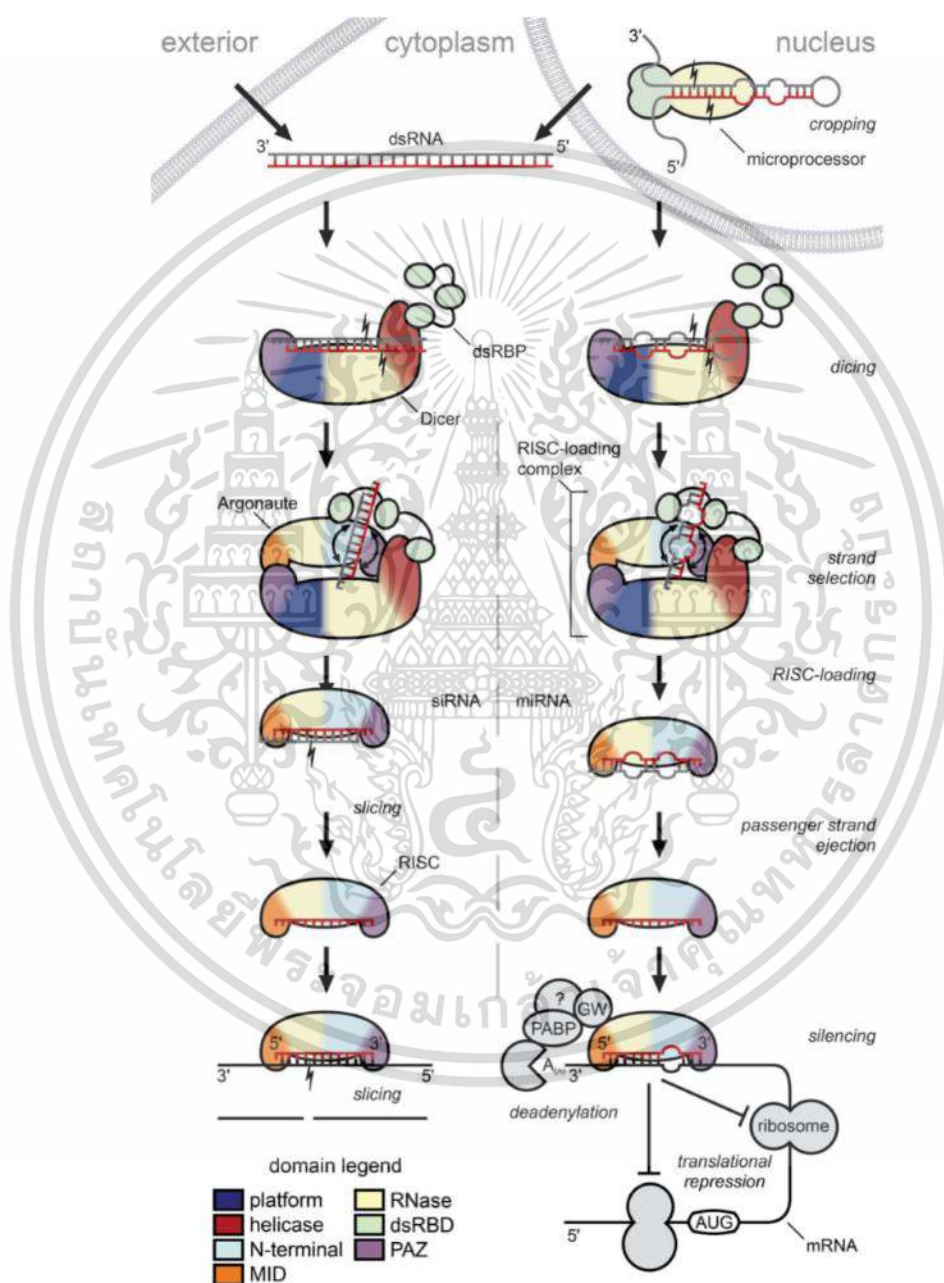


ภาพที่ 2.3 แสดงบทบาทของยีน STX16 ในกระบวนการออโตฟาจี โดยมีรายงานว่ามี 2 บทบาท ดังนี้ (A) โปรตีน STX16 ช่วยในการขยายโครงสร้างโครงสร้างฟาร์โกพอร์ เพื่อให้เกิดเป็นออโตฟาโกโซม เกิดจากการรวมตัวกันของโครงสร้าง SNARE complex ซึ่งประกอบไปด้วย STX16 VAMP7 และ SNAP7 และมีการเหนี่ยวนำให้ ATG9 ติดอยู่บน recycling endosome เข้ามาจับ ทำให้เกิดการขยายของโครงสร้างฟาร์โกพอร์ (B) โปรตีน STX16 เกี่ยวกับขั้นตอนการเหนี่ยวนำให้เกิดการรวมกันของออโตฟาโกโซม และไลโซโซม ทำให้เกิดโครงสร้าง ออโตไลโซโซม (autolysosome) เพื่อย่อยและกำจัดสารภายในถุงออโตฟาโกโซม (Tang, 2019)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 กระบวนการ RNA interference

RNA interference หรือ RNAi เป็นกลไกที่สำคัญในการยับยั้งการแสดงออกของยีน โดยเป็นกระบวนการทำลาย messenger RNA (mRNA) ของยีนเป้าหมาย ส่งผลให้การแสดงออกของยีนลดลง ซึ่งกลไกการทำงานของ RNAi จะเกิดจากการทำงานของ short interference RNA (siRNA) และ Micro RNA (miRNA) (Hu et al., 2020) (แสดงในภาพที่ 2.3)



ภาพที่ 2.4 แสดงกลไกการทำงานของ siRNA (ซ้าย) และ miRNA (ขวา) (Wilson and Doudna.,

2013)
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.1 short interference RNA (siRNA)

กระบวนการ RNAi เริ่มต้นเมื่อมีใส่ long-double stand RNA (dsRNA) เข้ามาในเซลล์ จากนั้นอาร์เอ็นเอสายคู่ยาว (long dsRNA) จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ไดเซอร์ (Dicer) ซึ่งเป็นเอนไซม์เอนโดไรโบนิวคลีเอส (endoribonuclease) และได้เป็น short interference RNA (siRNA) มีความยาวประมาณ 21-25 นิวคลีโอไทด์ (nucleotides) (Bernstein et al., 2001) มีปลาย 3' ยื่นเลยปลาย 5' ออกมาจำนวน 2 นิวคลีโอไทด์ จากนั้น siRNA จะรวมเข้ากับ RNA-induced silencing complex (RISC) และ siRNA จะถูกคลายเกลียวจากสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว (Hammond, 2005) หลังจากที่ RISC จับกับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย (mRNA) จะทำให้เกิดการทำลายเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย (Martineset al., 2002)

2.7.2 Micro RNA (miRNA)

miRNA ทำหน้าที่ ควบคุมการแสดงออกของยีน โดยกระบวนการเกิด miRNA เริ่มจากการถอดรหัสของ endogenous gene ได้ long-primary miRNA หลังจากนั้นจะถูกตัดด้วยเอนไซม์ในกลุ่ม RNase ชื่อว่า Drosha (Lee et al., 2003) หลังจากถูกตัดจะเรียกว่า miRNA ซึ่งจะทำให้มีความยาวประมาณ 21-25 นิวคลีโอไทด์ miRNA สามารถเข้าจับกับโปรตีน Argonaute ได้เป็น RISC โดยจะทำให้เหลือเพียงเส้น Guide strand เท่านั้น จากนั้น RICK จะเข้าจับกับ mRNA เป้าหมาย เนื่องจากเส้น Guide strand เป็นตัวเหนี่ยวนำให้ไปจับ จากนั้นเกิดการจับกันเป็นบางส่วนระหว่าง miRNA และเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งทำให้เอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายไม่ถูกตัดโดยโปรตีน Argonaute แต่ miRNA จะไปยับยั้งการแสดงออกของยีนในระดับการแปลรหัส (translation repression) หรือการสังเคราะห์โปรตีน (Pillai et al., 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมของยีน STX16

3.1.1 การสืบค้นข้อมูล

ค้นหาข้อมูลของยีน/โปรตีนที่ทำงานในกระบวนการออโตฟาจี ที่อาจจะมีส่วนสำคัญ หรือมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการติดไวรัสในสิ่งมีชีวิต โดยทำการสืบค้นวารสาร และผลงานตีพิมพ์ของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้ยีนที่สนใจนำมาศึกษาต่อ คือ Syntaxin (STX16)

3.1.2 การหา Conserve domain

1. ค้นหาลำดับสารพันธุกรรมของ STX16 ในกุ้งขาว *Penaeus vannamei* จากฐานข้อมูล NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
2. เลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) เฉพาะบริเวณ CDS (Coding Sequence) ไปทำการแปลรหัส (Translate) ให้ได้เป็นลำดับกรดอะมิโน (amino acid) ด้วยโปรแกรม Translate tool ใน Exspasy (<https://web.expasy.org/translate/>)
3. นำลำดับกรดอะมิโนของ STX16 มาทำนาย conserved domain ด้วยโปรแกรม SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>)

3.1.3 การสร้าง phylogenetic tree

1. ค้นหาลำดับกรดอะมิโนของ STX16 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 STX16 จากแต่ละสิ่งมีชีวิตมาเปรียบเทียบ โดยเลือกคำสั่ง 'alignment' โดยการเปิด fasta file ผ่านโปรแกรม MEGA11 และบันทึกไฟล์เป็นรูปแบบ .MEGA
4. ทำการสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA11
 - 4.1 เลือก 'Phylogeny → 'Construct/Test Neighbor – Joining Tree ...'
 - 4.2 เปิดไฟล์ MEGA ที่ได้บันทึกไว้
 - 4.3 ตรงกรอบ phylogeny test ให้กำหนดค่า ดังนี้

Test of Phylogeny → Bootstrap method

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จำนวนอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 4.4 กด 'OK' เพื่อให้โปรแกรมสร้าง phylogenetic tree ของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *STX16* ในเนื้อเยื่อต่างๆ

นำ cDNA ที่ได้จากเนื้อเยื่อต่างๆ ประกอบด้วย เหงือก (Gill) ลำไส้ (Intestine) ต่อม้ำเหลือง (Lymphoid organ) หัวใจ (Heart) กระเพาะ (Stomach) ตับและตับอ่อน (Hepatopancreas) และ เลือด (Hemocyte) มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *STX16* ด้วยเทคนิค quantitative PCR (qPCR) เริ่มจากการเตรียมส่วนประกอบสำหรับการทำ qPCR โดยใช้ส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา qPCR และอุณหภูมิ ดังแสดงในตารางที่ 3.1 และตารางที่ 3.2 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.1 แสดงส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา qPCR (PCR reaction)

ส่วนประกอบ	1X (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	95 °C	1 นาที	40 รอบ
Denaturation	95 °C	15 วินาที	
Annealing	60 °C	30 วินาที	
Melt curve	60 - 95 °C	7 นาที	

ในการทดลองนี้ ได้ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *STX16* control โดยจะทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน Elongation factor – 1 alpha (*EF-1α*) ซึ่งเป็น House keeping gene ที่มีการแสดงออกคงที่ โดยจะใช้เป็น internal control และทำการวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีน *STX16* ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ตามสมการ (mathematic model) ของ Pfaffli ที่กำหนดค่า relative expression เท่ากับ $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Pfaffli, 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *STX16* ในกึ่งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว

3.3.1 การเตรียมบ่อสำหรับเลี้ยงตัวอย่างกึ่ง และการเก็บตัวอย่างกึ่งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว

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

3.3.2 การสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างกึ่ง

- นำตัวอย่างกึ่งที่อยู่ใน Genezol มาทำการสกัดอาร์เอ็นเอ เริ่มจากการ เติมน้ำ Chloroform 100 μL จากนั้นทำการผสมให้เข้ากันโดยการ vortex เป็นเวลา 30 วินาที นำไปทำการปั่นเหวี่ยง (centrifugation) ที่ความเร็ว 12,500 $\times g$ ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที
- เมื่อทำการปั่นเหวี่ยงเสร็จแล้ว จะได้สารละลายเป็น 3 ส่วน คือส่วนของสารละลายใส (ชั้นบน) ตะกอนโปรตีน (ชั้นกลาง) และส่วนของสารละลายใสสีชมพู (ชั้นล่าง) ให้ทำการดูดสารส่วนใส มาใส่ หลอด 1.5-mL ใหม่ จากนั้นเติมน้ำ isopropanol (ที่เย็น) 1 volume แล้วทำให้เข้ากันโดยการ พลิกหลอดกลับไปมาจำนวน 20 ครั้ง และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที
- จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,500 $\times g$ ที่ อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาทีจากนั้นเทส่วนใสทิ้ง และเหลือตะกอนสีขาวขุ่นที่ก้นหลอด
- เติมน้ำ 70% Ethanol (ที่เย็น) 500 μL แล้วทำให้สารละลายเข้ากันโดย พลิกหลอดกลับไปมาจำนวน 20 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ที่ความเร็ว 12,500 $\times g$ ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที
- เทส่วนใสทิ้ง จะเหลือตะกอน จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงอีกรอบที่ความเร็ว 12,500 $\times g$ อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที
- ดูดสารละลายที่เหลือออกจนหมดให้เหลือไว้เพียงตะกอนเท่านั้น แล้วเปิดฝาหลอดทดลอง เอาไว้ เพื่อเป็นการตากตะกอน (air dry) รอจนตะกอนเปลี่ยนสี จากสีขาวขุ่นเป็นสีใส

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. เติมน้ำ DEPC เพื่อละลายตะกอน โดยตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที โดยทุกๆ 10 นาที จะทำให้เข้ากัน (mix) และ spin down
8. วัดค่าความเข้มข้นด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer เริ่มจากเปิดเครื่อง nanodrop ตั้งค่า blank โดยใช้ น้ำ DEPC ทำการปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1 μL กดปุ่มวัดความเข้มข้น และทำการบันทึก เมื่อวัดเสร็จแล้วให้ทำการล้างด้วยน้ำ DEPC อีกครั้งเพื่อทำความสะอาด
9. อาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างกุ้ง เมื่อวัดความเข้มข้นแล้วจะนำมาปรับให้มี ความเข้มข้นเท่ากัน ถ้าเป็นตัวอย่างจากเม็ดเลือดจะปรับให้มีความเข้มข้น 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ และถ้าเป็นตัวอย่างจากเหงือกจะปรับให้มีความเข้มข้น 300 $\text{ng}/\mu\text{L}$ เพื่อนำไปใช้ในการสร้าง cDNA ต่อไป

3.3.3 การสร้าง first – stranded cDNA

1. นำตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาสร้างเป็น cDNA ด้วยชุด RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermoscientific) โดยทำการเตรียมสารประกอบ ตามตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 แสดงส่วนประกอบจากชุด RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermoscientific) ของสารที่ใช้ในการสร้าง cDNA

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

2. จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง PCR เพื่อสร้าง cDNA ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 90 นาที และอุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 15 นาที
3. เก็บ cDNA ที่ -20°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *STX16*

นำ cDNA ที่สร้างได้มาทำให้เจือจาง 5 เท่า ด้วยน้ำ UP H₂O จากนั้นนำไปใช้เป็นแม่แบบ (DNA template) ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *STX16* ในกึ่งที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยเทคนิค qPCR (ตามรายละเอียดที่ระบุในหัวข้อ 3.2)

3.4 การสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับยีน *STX16* (Jaree et al., 2022)

1. ทำการเพิ่มจำนวน (Amplification) DNA ของยีน *STX16* จาก cDNA ของกึ่งขาวก่อน 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 ข้ามคืน สำหรับการสกัดพลาสมิด (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.7)
9. นำพลาสมิดที่สกัดได้มาตรวจสอบ ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.8) ทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis และนำพลาสมิดไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.2)
10. นำพลาสมิดที่ได้มาใช้เป็นแม่แบบ ในการเพิ่มจำนวน DNA ที่มีการต่อส่วนของ T7 promoter สำหรับการนำไปผลิตอาร์เอ็นเอสายคู่ หรือ dsRNA ด้วยเทคนิค qPCR (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.9)

11. นำ PCR product ที่ได้ มาทำให้บริสุทธิ์ (PCR purification) (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.3) ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

12. ตรวจสอบ purified PCR product ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis และนำไปวัดความเข้มข้นด้วย nanodrop spectrophotometer (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.2)
13. ทำการสร้าง dsRNA ที่จำเพาะกับยีน *STX16* หรือ dsSTX16 (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.10)

3.4.1 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (PCR amplification)

ตารางที่ 3.4 แสดงส่วนประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μL)
UP H ₂ O	40.25
10x PCR buffer	5
10 μM dNTPsmix	1
10 μM Forward primer	0.75
10 μM Reward primer	0.75
Taq DNA polymerase	0.25
cDNA ของกุ้งขาว	2
total Volume	50

ตารางที่ 3.5 แสดงขั้นตอนการทำ PCR (PCR amplification)

ขั้นตอน	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	

3.4.2 การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis และ การวัดความเข้มข้นด้วย nanodrop spectrophotometer

1. เทคนิค agarose gel electrophoresis
 - 1.1 เตรียม agarose gel ความเข้มข้น 1.2% เริ่มจากการชั่ง agarose gel 1.2 กรัม ใส่ในขวด หรือ flask
 - 1.2 เติมนั้ฟเฟอร์ 1xTBE ปริมาตร 100 mL
 - 1.3 ทำให้เจลละลายโดยการนำไปเข้าไมโครเวฟเป็นเวลา 1-2 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 เมื่อได้สารละลาย agarose gel ที่สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน วางพักไว้จนอุณหภูมิประมาณ 60 °C เติมสารย้อมดีเอ็นเอ (Red safe) 3 และ 5 μL ตามปริมาตรเจล 15 และ 25 mL ตามลำดับ

2. การวัดความเข้มข้นด้วย nanodrop spectrophotometer

2.1 วัดค่าความเข้มข้นด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer

2.2 เปิดเครื่อง nanodrop

2.3 ตั้งค่า blank โดยใช้ น้ำ DEPC

2.4 ทำการปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1 μL กดปุ่มวัดความเข้มข้นและทำการบันทึก

2.5 เมื่อวัดเสร็จแล้วให้ทำการล้างด้วยน้ำ DEPC อีกครั้งเพื่อทำความสะอาด

โดยจะทำการบันทึกอัตราส่วนการดูดกลืนแสง 260/280 ($A_{260/280}$) เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนในโปรตีน ถ้าค่าที่วัดได้มากกว่าหรือเท่ากับ 1.8 จะสามารถบอกได้ว่าตัวอย่าง DNA นั้นไม่มีโปรตีนปนเปื้อนและอัตราส่วนการดูดกลืนแสง 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

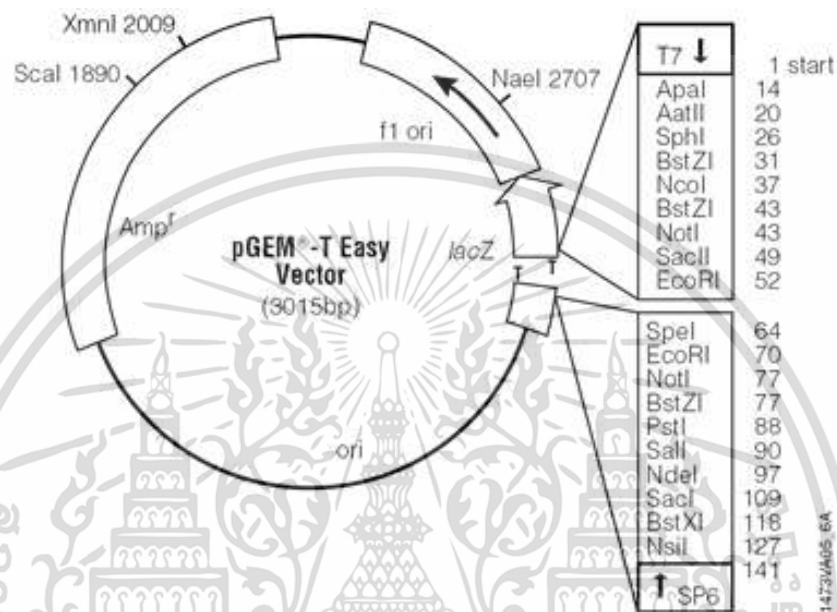
GenepHlow™ Gel/PCR (Geneaid)

1. ในขั้นตอนการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ สามารถทำได้ 2 แบบ แบบแรกคือการรัน PCR product ด้วย agarose gel จากนั้นตัดชิ้นส่วนเจลเฉพาะบริเวณที่ต้องการ ส่วนที่สองคือนำสารละลาย PCR product มาทำให้บริสุทธิ์เลย โดยแบบแรกเมื่อตัดชิ้นส่วนเจล และนำไปละลายเจลที่อุณหภูมิ 55°C 15 นาที spin down รวบรวมเจลทั้งหมด ส่วนแบบที่สองสามารถเติม Gel/PCR buffer 5 volume ต่อ PCR product 1 volume และทำขั้นตอนต่อไปได้เลย
2. ประกอบ column และ collection tube จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่างใส่ column 800 μL แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 $\times g$ 30 วินาที ที่สารละลายใน collection tube
3. เติม W1 buffer 400 μL แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 $\times g$ 30 วินาที ที่สารละลายใน collection tube และเติม Wash buffer 600 μL ตั้งทิ้งไว้อุณหภูมิห้อง 1 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 $\times g$ 30 วินาที ที่สารละลายใน collection tube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 11,000 $\times g$ 3 นาที
4. ย้าย column ไปหลอดทดลอง 1.5-mL จากนั้นเติม UP H₂O (ที่ผ่านการอุ่นให้ร้อน) ปริมาตร 20-50 μL ลงใน column ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- นำ DNA ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (purified PCR product) ที่ได้มาวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer และทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis (ตามที่ได้ระบุไว้ใน หัวข้อ 3.4.2)

3.4.4 การ ligation



ภาพที่ 3.1 pGEM®-T Easy Vector (promega)

ตารางที่ 3.6 แสดงส่วนประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการทำ ligation

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (μL)
Nuclease-free water	3.5
10X Rapid Ligation buffer	1
pGEM-T easy vector (50ng/ μL)	0.5
PCR product	4
T4 DNA ligase	1
Total Volume	10

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

3.4.5 การ Transformation

- นำ competent cell *E. coli* สายพันธุ์ DH-α5 มาเติมสารละลาย ligation mixture 5 μL ที่เตรียมไว้ แล้ววางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
 - นำให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 1 นาที และนำไปแช่เย็นไว้บนน้ำแข็ง
- ไม่่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เติมหาอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 900 μL แล้วนำไปเลี้ยงที่เครื่อง shaker อุณหภูมิ 37°C 200 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (selective media) สำหรับการทำให้ blue-white screening โดยนำยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (Ampicillin) Amp, X-gal, IPTG มาทำการ spread ลงบนอาหาร LB agar (แสดงในตารางที่ 3.8)
5. นำเชื้อที่บ่มไว้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 rpm 3 นาที เทอาหารออกบางส่วน นำอาหารที่เหลือมาละลายตะกอน และทำการ spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ และนำไปบ่มที่ 37°C ซ้ำมคืน

ตารางที่ 3.7 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ LB

ส่วนประกอบ	ปริมาณ
Yeast extract	0.5 g
Peptone	1 g
NaCl	1 g
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 (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เลือก positive colony มา 3 โคโลนี นำไปเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Amp จากนั้นนำไปเลี้ยงที่ shaker อุณหภูมิ 37°C 200 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

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)

ขั้นตอน	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 Plasmid extraction โดย Presto™ Mini Plasmid Kit (Geneaid)

- นำหลอดที่เลี้ยงเชื้อไว้ ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 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 แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 xg เป็นเวลา 10 นาที
- เตรียม PDH column ขนาด 2 mL จากนั้นปิเปตส่วนใส่ทั้งหมดประมาณ 700 μL ลงใน PDH column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 xg เป็นเวลา 30 วินาที และทิ้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์และเผยแพร่ในนามของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ปิเปต W1 400 μL ลง column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 xg เป็นเวลา 30 วินาทีและทิ้งสารละลายที่อยู่ใน collection tube ทิ้ง
6. ปิเปต Wash buffer 600 μL ลงใน column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 xg เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งสารละลายที่อยู่ใน collection tube ทิ้งและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 xg ต่ออีก 3 นาที จากนั้นนำ column ใส่หลอด 1.5-mL ใหม่
7. ใส่ Elution buffer 35 μL ทิ้งไว้ 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 xg เป็นเวลา 2 นาที
8. นำสารละลายพลาสมิดไปวัดความเข้มข้น ด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer (ตามที่ได้ระบุไว้ใน หัวข้อ 3.4.2)

3.4.8 ทำการคัดเลือก positive clone ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

1. นำพลาสมิดที่สกัดได้มา cut check ด้วย restriction enzyme *EcoRI* โดยมีรายละเอียดตามตารางที่ 3.11
2. ทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis (ตามที่ได้ระบุไว้ใน หัวข้อ 3.4.2)

ตารางที่ 3.11 แสดงส่วนประกอบของสารที่ใช้ในการ cut check ด้วย restriction enzyme

<i>EcoRI</i>	
ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μL)
H ₂ O	3.5
10X buffer	1
Plasmid	5
Enzyme	0.5
Total volume	10

บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

3.4.9 การเพิ่มจำนวน DNA แม่แบบ สำหรับการนำไปผลิต dsRNA

1. นำพลาสมิดที่สกัดได้ มาเป็น DNA template ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอแม่แบบ สำหรับการสร้าง dsRNA โดยการนำไปเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR ตามตารางที่ 3.12
2. ตรวจสอบ PCR product ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis
3. นำ PCR product มา PCR purification ด้วย GeneHlow™ Gel/PCR Kit (Geneaid)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า (ตามที่ได้ระบุไว้ใน หัวข้อ 3.4.3) ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. วัดความเข้มข้นของ purified PCR product ด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer และตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.2)

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)

ขั้นตอน	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	

3.4.10 การสร้าง dsRNA ที่จำเพาะกับยีน *STX16* (dsSTX16)

1. ทำการสร้าง dsSTX16 ด้วยชุด T7 Ribomax™ Express Large Scale RNA production system (Promega) ตามรายละเอียดที่ระบุในตารางที่ 3.14 โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
2. เติม RQ1 RNase-free DNase 1 μL และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 นาที
3. นำสารละลาย RNA หลอด sense และ anti-sense มารวมกันแล้วนำไป heat ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็น 30 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. นำสารละลายดังกล่าว มาใส่ในหลอด 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
5. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,500 xg เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C แล้วเติม 70% Ethanol ที่เย็น 500 μ L นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,500 xg เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เทสารละลายทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,500 xg เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C
6. ใช้ปิเปตดูดสารละลาย ที่เหลือออกให้หมด และเปิดฝาดาทากตะกอน รอนจนตะกอนเปลี่ยนสี จากสีขาวขุ่นไปเป็นสีใสใช้เวลาประมาณ 15-20 นาที
7. เติมน้ำ DEPC เพื่อละลายตะกอน
8. วัดความเข้มข้น dsRubicon ด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer และตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis (ตามรายละเอียดที่ระบุในหัวข้อ 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 dsSTX16 ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน STX16 ในกิ้ง

ในการทดลองนี้จะแบ่งกิ้งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ 1) กิ้งที่ฉีดด้วย dsGFP ซึ่ง dsGFP ไม่จำเพาะกับยีนในกิ้ง เป็นกลุ่มควบคุม และ 2) กิ้งที่ฉีดด้วย dsSTX16 เป็นกลุ่มทดลอง โดยจะทำการตรวจหาความเข้มข้นของ dsRNA ที่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน STX16 ในกิ้งได้ ซึ่งจะใช้ 2 ความเข้มข้นคือ 1 และ 2.5 μ g ต่อกรัมกิ้ง ในการทดลองนี้จะใช้กิ้งขาวสุขภาพดี ขนาด 2-3 กรัม เริ่มจากการฉีดสารละลาย dsRNA หลังจากฉีด dsRNA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะทำการเก็บตัวอย่างเหวี่ยง นำไปสกัด

อาร์เอ็นเอ (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.3.2) จากนั้นวัดความเข้มข้นด้วย nanodrop เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ถูกนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า spectrophotometer และนำไปสร้าง first-strand cDNA (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.3.3) ทำการไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจสอบประสิทธิภาพของ dsSTX16 ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *STX16* ด้วยเทคนิค qPCR (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.2)

3.6 การศึกษาบทบาทของยีน *STX16* ในกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว

3.6.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *STX16* และยีนไวรัส *VP28* ในกุ้ง

ในการทดลองนี้ได้แบ่งกุ้งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรก กุ้งที่ถูกฉีดด้วย dsGFP และกลุ่มที่สอง คือ กุ้งที่ถูกฉีดด้วย dsSTX16 โดยจะฉีด dsRNA ที่ความเข้มข้น 1 µg/g shrimp หลังจากฉีด dsRNA 24 ชั่วโมง จะฉีดสารละลายไวรัสตัวแดงดวงขาว ทำการเก็บตัวอย่างกุ้ง (เหงือกและเลือด) หลังติดไวรัสที่เวลา 24 30 และ 48 ชั่วโมง นำไปสกัดอาร์เอ็นเอ (ตามที่ได้ระบุไว้ใน หัวข้อ 3.3.2) จากนั้นวัดความเข้มข้นด้วย nanodrop spectrophotometer และนำไปสร้าง first-strand cDNA (ตามที่ได้ระบุไว้ใน หัวข้อ 3.3.3) ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *STX16* และยีนไวรัส *VP28* ด้วยเทคนิค qPCR (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.2)

3.6.2 การบันทึกอัตราการตายของกุ้ง

ทำการบันทึกอัตราการตายของกุ้งกลุ่มตัวอย่างตามที่ระบุในข้อ 3.6.1 หลังจากฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาวทุกๆ 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 (ตามรายละเอียดที่ระบุในหัวข้อ 3.6.3.1) (Mendoza-Cano and Sanchez-Paz, 2013) จากนั้นทำการตรวจสอบปริมาณไวรัส เทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) ด้วยเทคนิค qPCR (ตามรายละเอียดที่ระบุในหัวข้อ 3.6.3.2) และทำการวิเคราะห์ผลการทดลอง

3.6.3.1 สกัด genomic DNA

1. ตัดตัวอย่างเหงือกกุ้ง ใส่หลอด 1.5-mL เติม FATG1 buffer ปริมาตร 200 µL และทำการบดให้เป็นเนื้อเดียว
2. เติม Proteinase K (10mg/mL) ปริมาตร 20 µL และทำให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex และนำไปต้มไปที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
3. จากนั้นเติม FATG2 Buffer ปริมาตร 200 µL และทำให้เข้ากันโดย vortex และนำไปต้ม 70°C เป็นเวลา 10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 xg เป็นเวลา 10 นาที ปิดเตาสารละลายส่วนใส ไปใส่หลอด 1.5-mL ใหม่
5. เติม Absolute ethanol 200 μ L และทำให้เข้ากันโดย vortex และ spin down
6. ประกอบ Column ปิดเตาสารละลายทั้งหมดใส่ Column และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 xg เป็นเวลา 1 นาที และเทสารละลายใน collection tube ทิ้ง
7. เติม W1 Buffer 400 μ L และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 xg เป็นเวลา 1 นาที และเทสารละลายใน collection tube ทิ้ง
8. เติม Wash Buffer 750 μ L และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 xg เป็นเวลา 1 นาที และเทสารละลายใน collection tube ทิ้ง จากนั้นทำการ air dry column โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 xg เป็นเวลา 3 นาที
9. เติม Elution buffer 30-50 μ L โดยหยดลงตรงกลาง column ทิ้งไว้ 3 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 xg เป็นเวลา 2 นาที เพื่อ elute genomic DNA
10. นำไปวัดความเข้มข้นด้วย nanodrop spectrophotometer และตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis (ตามรายละเอียดที่ระบุในข้อ 3.4.2)

3.6.3.2 quantitative PCR

สร้าง standard curve ที่มีปริมาณไวรัส $10^3 - 10^7$ viral copies จากนั้นนำตัวอย่าง gDNA ที่ความเข้มข้นเท่า ๆ กันมาทำการตรวจสอบหาปริมาณไวรัสด้วยเทคนิค qPCR ตามตารางที่ 3.15 และ 3.16 และใช้อุณหภูมิตามรายละเอียดที่ระบุไว้ในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.15 แสดงส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา qPCR (PCR reaction)

ส่วนประกอบ	1X (μ L)
Luna qPCR mix enzyme (NEB)	5
10 μ M forward primer	0.15
10 μ M reverse primer	0.15
UP H ₂ O	3.7
Standard plasmid	1
Total Volume (master mix = 9 μ L)	10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.16 แสดงส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา qPCR (PCR reaction)

ส่วนประกอบ	1X (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

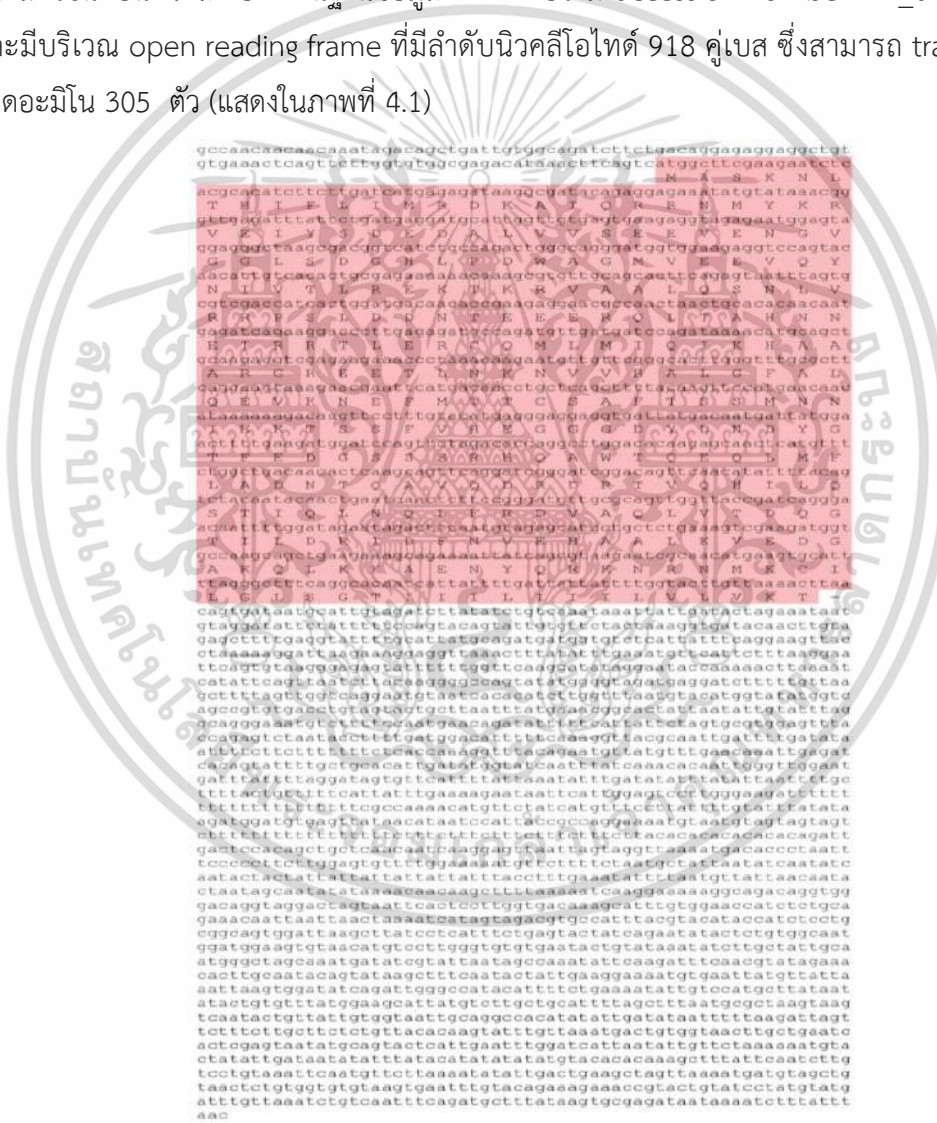
บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรม

4.1.1 การค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์

จากการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ STX16 ในกุ้ง *Penaeus vannamei* และสัตว์ชนิดอื่นที่ใกล้เคียง ผ่านฐานข้อมูล NCBI พบว่ามี accession number XM_027350891.1 และมีบริเวณ open reading frame ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 918 คู่เบส ซึ่งสามารถ translate เป็นกรดอะมิโน 305 ตัว (แสดงในภาพที่ 4.1)

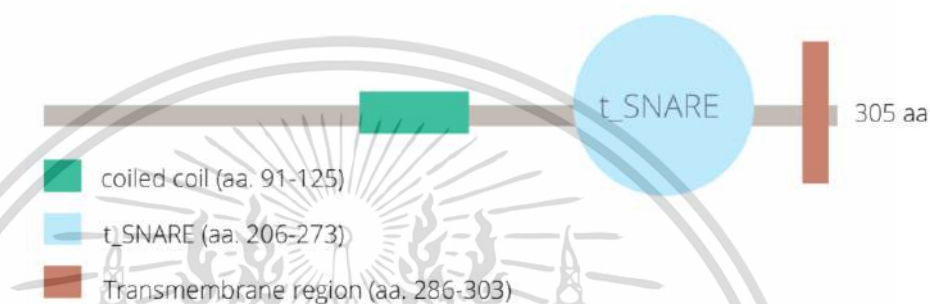


ภาพที่ 4.1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ STX16 ของกุ้งขาว *Penaeus vannamei*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 ทา conserve domain

จากการนำลำดับกรดอะมิโนของ STX16 มาทำนาย conserved domain พบว่ามี 3 conserved domain คือ coiled coil ที่ลำดับกรดอะมิโน 91-125, t-SNARE ที่ลำดับกรดอะมิโน 206-273 และ Transmembrane region ที่ลำดับกรดอะมิโน 286-303 (แสดงในภาพที่ 4.2) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า target-localized (t-SNARE) เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญในการขนส่งเวสิเคิล (vesicle) ไปยังเมมเบรนเป้าหมาย เพื่อทำให้เกิดการหลอมรวม (Schiavo et al., 1997)



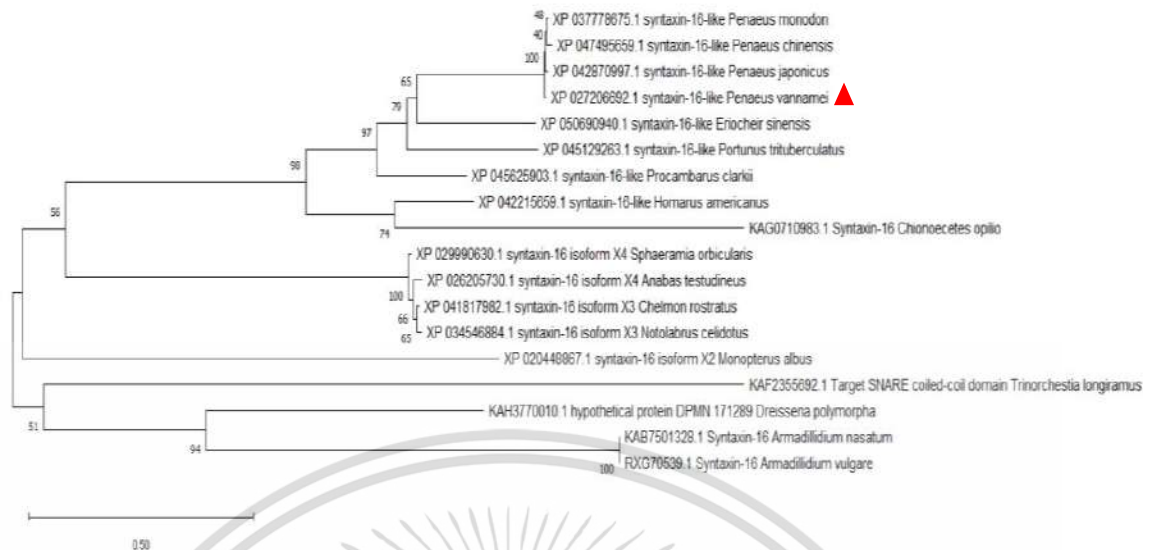
ภาพที่ 4.2 แสดงข้อมูลเกี่ยวกับ conserve domain ของโปรตีน STX16

จากการนำลำดับกรดอะมิโนของ STX16 ในสิ่งมีชีวิตอื่นมาทำนาย conserved domain เช่น *Penaeus japonicus*, *Penaeus chinensis*, *Penaeus monodon*, *Eriocheir sinensis* และ *Sphaeramia orbicularis* พบว่าในทุกสิ่งมีชีวิตที่กล่าวมาข้างต้น มี t-SNARE เป็น conserved domain ที่สำคัญเหมือนกันกับในกุ้งขาว *Penaeus vannamei* และจากการศึกษาพบว่า ในบรรดาตระกูล SNARE นั้น syntaxins (STXs) จะอยู่ในตระกูลย่อยของ target (t)-SNAREs ซึ่งเป็นโปรตีนประจำการที่เมมเบรนเป้าหมาย โดเมน SNARE ของ STX ประกอบด้วย coiled coil ซึ่งทำหน้าที่เหนี่ยวนำให้ t-SNARE เข้าจับกับโดเมน SNARE ของ cognate vesicle (v)-SNARE partners ที่เกาะงกับ vesicle membranes (Tang et al., 2001)

4.1.3 การสร้าง phylogenetic tree

จากการค้นหาลำดับกรดอะมิโนของ STX16 ในกุ้งและในสิ่งมีชีวิตอื่นที่ใกล้เคียงกับกุ้ง ผ่านฐานข้อมูล NCBI แล้ว นำมาสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA11 พบว่า STX16 ของกุ้ง *Penaeus vannamei* มีความใกล้เคียงกับ STX16 ของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* มากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



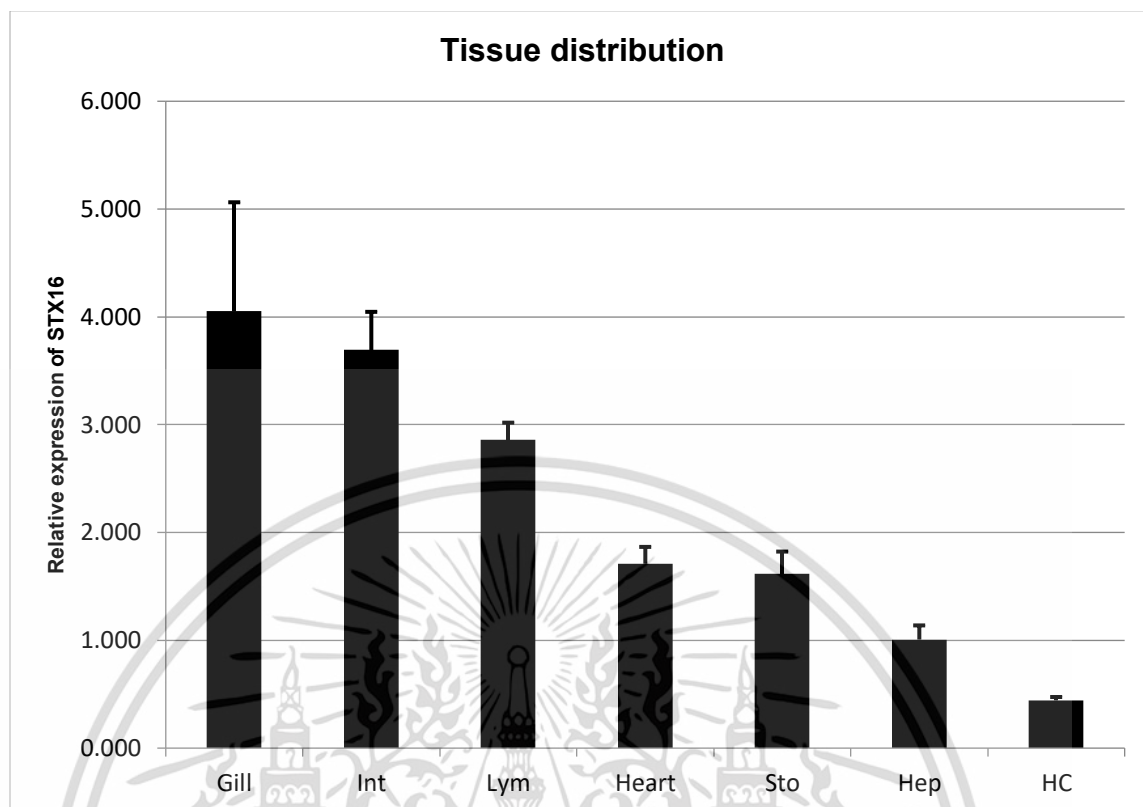
ภาพที่ 4.3 แสดงแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของโปรตีน STX16

จากแผนภูมิความสัมพันธ์ของ STX16 พบว่าสามารถจัดกลุ่มตามไฟลัม (Phylum) ได้ 3 ประเภท คือ อาร์โทรพอดา (Arthropoda) คอร์ดตาตา (Chordata) และมอลลัสกา (Mollusca) (แสดงในภาพที่ 4.3) โดย STX16 ของกุ้งขาว (*P. vannamei*) ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับพวก Arthropoda ซึ่งมีความใกล้เคียงกับ STX16 ของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* มากที่สุด โดยพบว่ามี % identity = 99.0 และ % similarity = 99.3 และยังมีค่าใกล้เคียงกับ *Penaeus japonicus* และ *Penaeus chinensis* โดยพบว่ามี % identity = 98.4 และ 97.4 % similarity = 99.3 และ 99.0 ตามลำดับ ซึ่งถือว่ามีค่าใกล้เคียงกันอย่างมากกับกุ้งขาว เนื่องจากสิ่งมีชีวิตทั้ง 3 เป็นสัตว์จำพวกกุ้งเหมือนกันจึงทำให้ % identity และ % similarity มีค่าที่สูงมาก โดยเมื่อเทียบกับปูชน (*Eriocheir sinensis*) สัตว์จำพวกปูที่อยู่ในไฟลัมอาร์โทรพอดาเช่นเดียวกัน พบว่ามีค่า % identity อยู่ที่ 80.4 และ % similarity 90.4 ซึ่งมีค่าต่ำกว่าสัตว์จำพวกกุ้ง และเมื่อเทียบความใกล้เคียงระหว่างกุ้งขาว (*P. vannamei*) กับ ปลาอมไข่ตาฟ้า (*Sphaeramia orbicularis*) ที่อยู่ในไฟลัมคอร์ดตาตาจะพบว่ามีค่า % identity = 40.2 และ % similarity = 58.8 ซึ่งมีค่าต่ำกว่าสัตว์ในไฟลัมเดียวกัน

4.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน STX16 ในเนื้อเยื่ออวัยวะ

จากการเลือก cDNA ของเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันมาทำ quantitative PCR พบว่าการแสดงออกของ STX16 พบมากที่สุดในเหงือก (Gill) ตามด้วยลำไส้ (Intestine; Int) ต่อม น้ำเหลือง (Lymphoid organ; Lym) หัวใจ (Heart) กระเพาะ (Stomach; Sto) ตับและตับอ่อน (Hepatopancreas) และน้อยที่สุดในเลือด (Hemocyte) (แสดงในภาพที่ 4.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



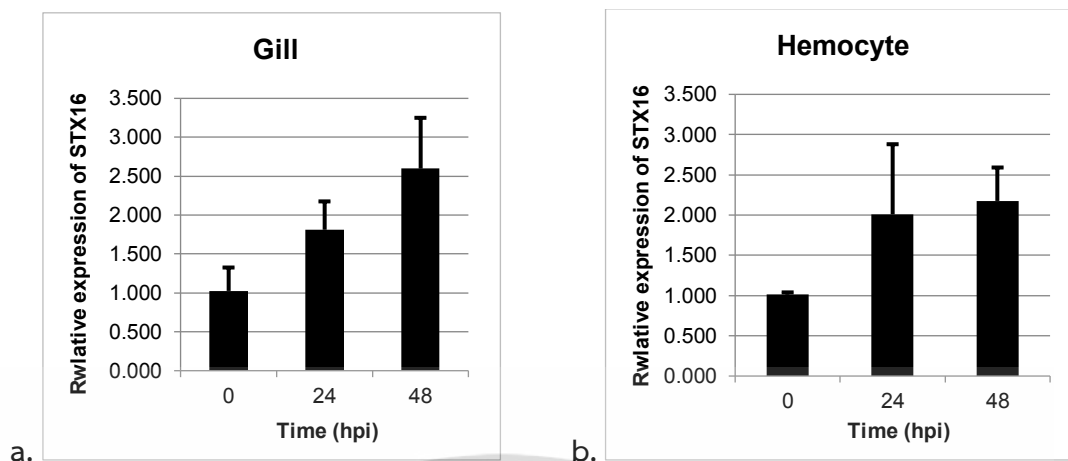
ภาพที่ 4.4 แสดงผลการแสดงออกของยีน *STX16* ที่พบในเนื้อเยื่อต่างๆ

จากการทดลองพบว่าการแสดงออกของยีน *STX16* พบมากที่สุดในเหงือก ซึ่งแตกต่างจากในคน เนื่องจากมีรายงานว่าในคนจะพบการแสดงออกของ *STX16* ในหัวใจและตับอ่อนมากกว่า (Tang et al., 1998)

4.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *STX16* ในกึ่งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว

จากผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *STX16* ในกึ่งที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาว พบว่าหลังจากกึ่งติดไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่ายีน *STX16* มีการแสดงออกมากขึ้นเมื่อเทียบกับกึ่งที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เวลา 0 ชั่วโมง (แสดงในภาพที่ 4.5) จึงสามารถสรุปได้ว่ายีน *STX16* มีแนวโน้มการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นเมื่อกึ่งติดโรคตัวแดงดวงขาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 การแสดงออกของยีน *STX16* เมื่อกุ้งติดไวรัสตัวแดงดวงขาว

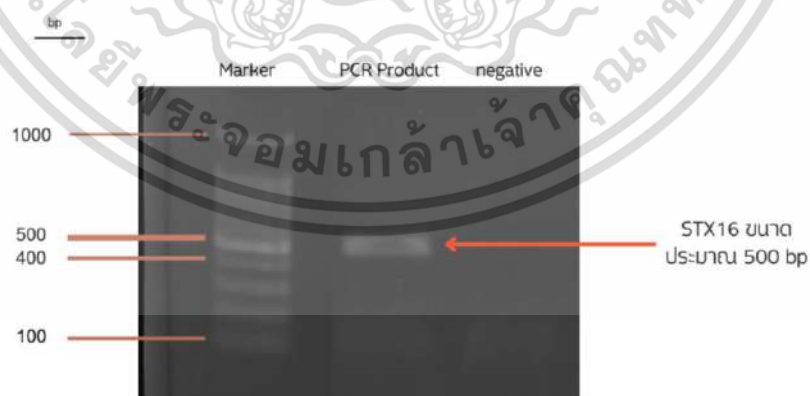
a. : การแสดงออกของยีน *STX16* ในเหงือก (Gill) กุ้ง หลังติดไวรัสตัวแดงดวงขาว

b. : การแสดงออกของยีน *STX16* ในเลือด (Hemocyte) กุ้ง หลังติดไวรัสตัวแดงดวงขาว

4.4 การสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับยีน *STX16*

4.4.1 การเพิ่มจำนวนยีน *STX16* ด้วยเทคนิค PCR (PCR amplification)

จากการเพิ่มจำนวนยีน *STX16* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ cDNA ของกุ้งขาวเป็นแม่แบบ และนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบว่า PCR product ที่มีขนาดประมาณ 450 bp (แสดงในภาพที่ 4.6) ซึ่งตรงกับขนาดของยีน *STX16* ตามคู่ primer ที่ได้ออกแบบไว้ จากนั้นนำไปตรวจสอบความเข้มข้นและคุณภาพด้วย nanodrop spectrophotometer ซึ่งได้ผลตามตารางที่ 4.1

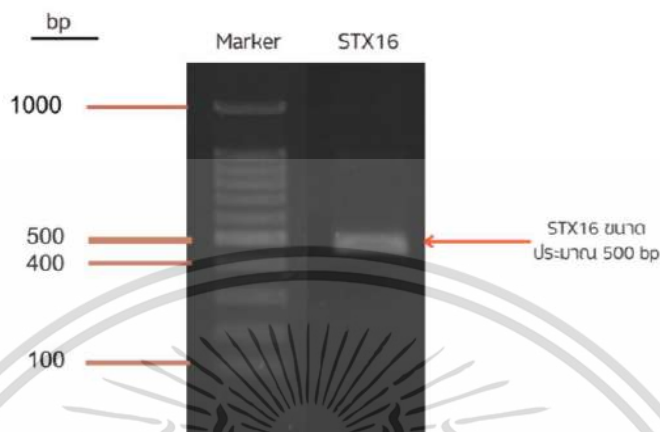


ภาพที่ 4.6 แสดงผลการตรวจสอบคุณภาพของ PCR product ของยีน *STX16* ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2 การทำชิ้นยีน *STX16* ให้บริสุทธิ์ (Purification of PCR product)

จากผลการทำชิ้นยีน *STX16* ให้บริสุทธิ์และนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบว่าชิ้น Purified *STX16* มีขนาดประมาณ 450 bp



ภาพที่ 4.7 แสดงผลการตรวจสอบคุณภาพของ purified PCR product ของยีน *STX16* ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

ตารางที่ 4.1 ผลการวัดความเข้มข้น purified PCR product ด้วย nanodrop spectrophotometer

	ความเข้มข้น	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
Purified- <i>STX16</i>	20.9 ng/ μ L	1.59	1.10

4.4.3 การคัดเลือกโคลนด้วยเทคนิค Blue-white screening

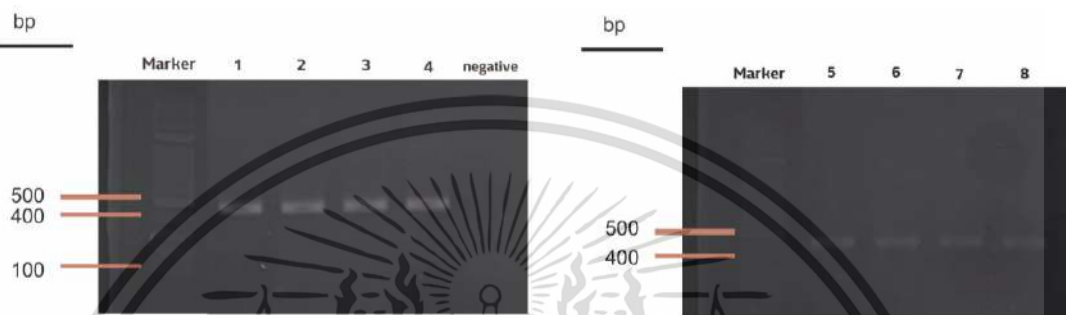
จากผลการคัดเลือกโคลนด้วยเทคนิค Blue-white screening ซึ่งจะเห็นว่ามีลักษณะเป็น โคลนสีขาวและสีฟ้า (แสดงในภาพที่ 4.8) โดยจะนำโคลนสีขาวไปทำการตรวจสอบต่อไป



เอกสารนี้ภาพที่ 4.8 นี้แสดงผลการคัดเลือกโคลนด้วยเทคนิค Blue-white screening ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.4 การคัดเลือกโคลนด้วยเทคนิค colony PCR

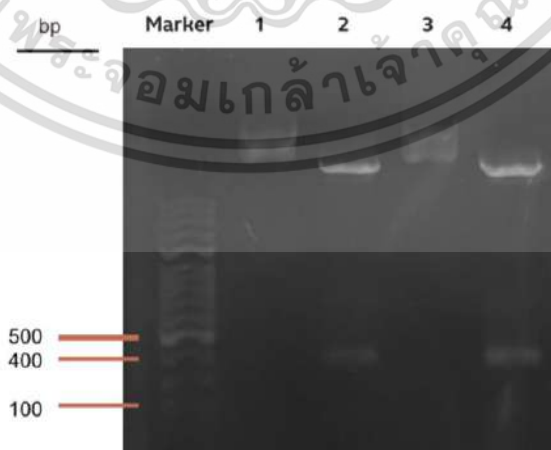
จากการนำโคโลนีสีขาวมาเป็นแม่แบบ ในการทำ PCR และทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ผลการทดลองพบว่า PCR Product มีขนาดประมาณ 450 bp ทุกโคโลนี (แสดงในภาพที่ 4.9) ซึ่งคาดว่าเป็นส่วนของยีน *STX16* จากนั้นทำการเลือก 2 โคโลนี คือ โคโลนีที่ 2 และ 3 โดยนำโคโลนีที่เลือกมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-amp ข้ามคืน จากนั้นเลือกเชื้อจากโคโลนีที่ 2 และ 3 มาสกัด plasmid ต่อไป



ภาพที่ 4.9 แสดงผลการคัดเลือกโคลนจากการทำ Colony PCR แสดงการตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

4.4.5 การคัดเลือกโคลนโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) *EcoRI*

นำพลาสมิดที่สกัดได้ (จากตารางที่ 4.2) มาทำการ cut check ด้วย restriction enzyme *EcoRI* ซึ่งพบว่า PCR product 1 ชิ้น ขนาด 450 bp (แสดงในภาพที่ 4.10) เนื่องจากเอนไซม์ *EcoRI* สามารถตัดชิ้นส่วนของยีน *STX16* ที่ใส่ไปในเวกเตอร์ pGEM-T easy และทำให้เกิด PCR product ขนาด 450 bp จากผลการทดลองดังกล่าว สรุปได้ว่าสามารถสร้างพลาสมิด pGEM-T/*STX16* ได้



ภาพที่ 4.10 แสดงผลการตรวจสอบการคัดเลือกโคลน ด้วยการใช้ *EcoRI* ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ทำงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- lane Maker 100 bp DNA maker
- lane 1 uncut pGEM-T/STX16 no.1
- lane 2 cut pGEM-T/STX16 *EcoRI* no.1
- lane 3 uncut pGEM-T/STX16 no.2
- lane 4 cut pGEM-T/STX16 *EcoRI* no.2

ตารางที่ 4.2 ผลการวัดความเข้มข้นของพลาสมิดด้วย nanodrop spectrophotometer

	ความเข้มข้น	A _{260/280}	A _{260/230}
pGEM-T/STX16 no.1	369.6 ng/μL	1.88	2.22
pGEM-T/STX16 no.2	353.7 ng/μL	1.88	2.23

4.4.6 การเพิ่มจำนวนยีน *STX16* และต่อ T7 promoter ด้วยเทคนิค PCR (PCR amplification)

จากการเพิ่มจำนวนยีน *STX16* ด้วย primer ที่มีส่วนของ T7 promoter ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ pGEM-T/STX16 เป็นแม่แบบ เมื่อนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบ PCR product ขนาดประมาณ 450 bp (แสดงในภาพที่ 4.11) ซึ่งคาดว่าเป็นยีน *STX16* ที่มีส่วนของ T7 promoter



ภาพที่ 4.11 แสดงผลการตรวจสอบ PCR Product ของยีน *STX16* ที่มีส่วนของ T7 promoter ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นที่มิได้มีเหตุบังเอิญที่ผู้แต่งและผู้พิมพ์เจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- lane 2 PCR product negative control (primer T7F/R)
- lane 3 PCR product STX16 (primer F/T7R)
- lane 4 PCR product negative control (primer F/T7R)

4.4.7 การทำชิ้นยีน *STX16* ที่มีส่วนของ T7 promoter ให้บริสุทธิ์ (purification of PCR product)

จากการทำชิ้นยีน *STX16* ที่มีส่วนของ T7 promoter ให้บริสุทธิ์ ด้วยเทคนิค PCR purification และนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบว่า PCR product ที่ได้มีขนาดประมาณ 450 bp (แสดงในภาพที่ 4.12) ซึ่งคาดว่าเป็นชิ้นยีน *STX16* ที่มีส่วนของ T7 promoter ที่บริสุทธิ์แล้วจากนั้นนำไปตรวจสอบความเข้มข้นและคุณภาพด้วย nanodrop spectrophotometer ซึ่งได้ผลตามตารางที่ 4.3



ภาพที่ 4.12 แสดงผลการตรวจสอบชิ้นยีน Purified *STX16*-T7F/R และ *STX16*-F/ T7R ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

- lane Marker 100 bp DNA maker
- lane 1 Purified *STX16* (primer T7F/R)
- lane 2 Purified *STX16* (primer F/T7R)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ผลการวัดความเข้มข้น purified PCR Product ของชิ้นยีน *STX16* ที่ต่อด้วย T7 promoter ด้วย nanodrop spectrophotometer

	ความเข้มข้น	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
STX16-T7F/R	147.3 ng/ μ L	1.80	2.10
STX16-F/ T7R	130.3 ng/ μ L	1.75	1.67

4.4.8 การสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับยีน *STX16* หรือ ds*STX16*

จากการสร้าง ds*STX16* ด้วยชุด T7 Ribomax™ Express Large Scale RNA production System (Promega) และตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis พบ band ขนาดประมาณ 450-500 bp (แสดงในภาพที่ 4.13) และเมื่อตรวจสอบความเข้มข้นด้วย nanodrop spectrophotometer พบว่ามีความเข้มข้น 3.14 μ g/ μ L (แสดงในตารางที่ 4.4)



ภาพที่ 4.13 แสดงผลการตรวจสอบ ds*STX16* ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

- lane Maker 100 bp DNA maker
- lane 1 ds*STX16*

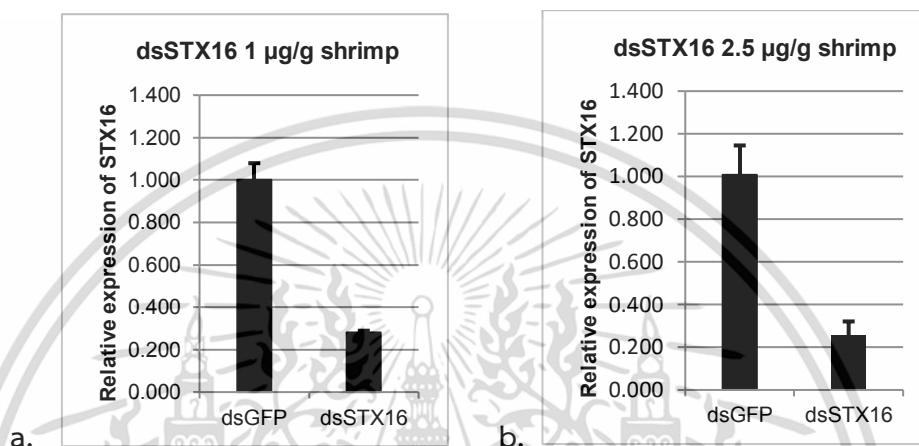
ตารางที่ 4.4 แสดงผลการวัดความเข้มข้น ds*STX16* ด้วย nanodrop spectrophotometer

	ความเข้มข้น	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
ds <i>STX16</i>	3.14 μ g/ μ L	2.04	2.16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การตรวจสอบประสิทธิภาพของ dsSTX16 ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *STX16* ในกุ้ง

จากผลทดสอบพบว่ากุ้งกลุ่มที่ฉีด dsSTX16 ที่ความเข้มข้น 1 และ 2.5 $\mu\text{g/g}$ shrimp สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *STX16* ได้ เมื่อเทียบกับกุ้งกลุ่มควบคุมคือกุ้งที่ถูกฉีดด้วย dsGFP (แสดงในภาพที่ 4.14) จากผลการทดลองนี้จึงเลือกใช้ dsSTX16 ที่ความเข้มข้น 1 $\mu\text{g/g}$ shrimp ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *STX16* สำหรับการทดลองต่อไป



ภาพที่ 4.14 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *STX16* ในกุ้งเมื่อถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *STX16* ด้วย dsSTX16

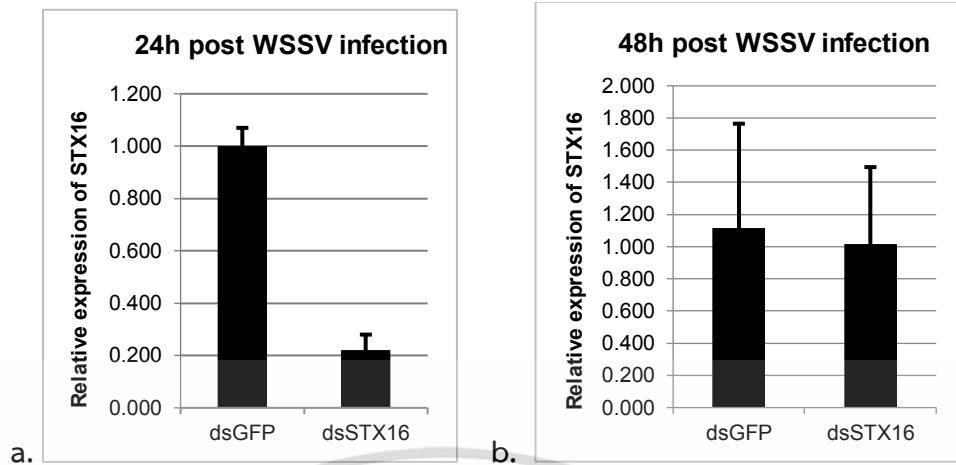
- a. : การแสดงออกของยีน *STX16* ในกุ้งกลุ่มที่ฉีด dsSTX16 ที่ความเข้มข้น 1 $\mu\text{g/g}$ shrimp
- b. : การแสดงออกของยีน *STX16* ในกุ้งกลุ่มที่ฉีด dsSTX16 ที่ความเข้มข้น 2.5 $\mu\text{g/g}$ shrimp

4.6 การศึกษาบทบาทของยีน *STX16* ในกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว

4.6.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *STX16* และยีนไวรัส VP28

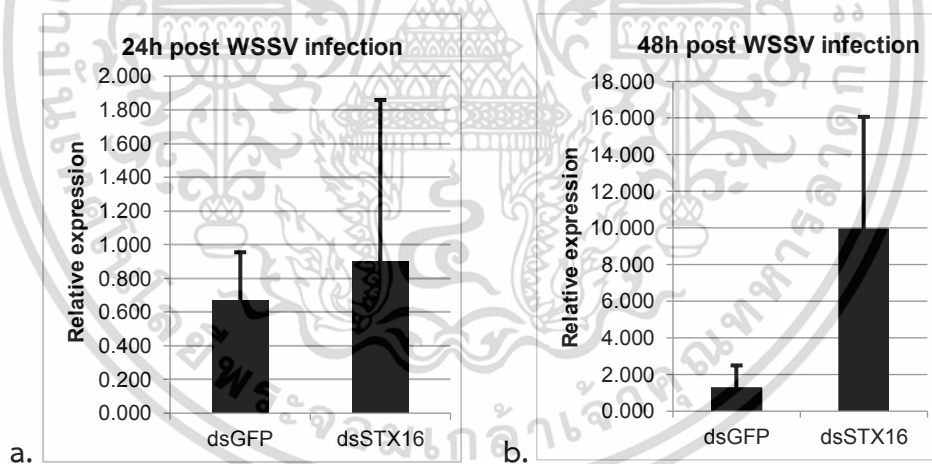
เริ่มจากการศึกษาบทบาทของยีน *STX16* ในเหงือกกุ้ง จากการทดลองพบว่าหลังกุ้งติดโรคตัวแดงดวงขาวที่เวลา 24 ชั่วโมง ในเหงือกกุ้งกลุ่มที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *STX16* ด้วย dsSTX16 มีการแสดงออกของยีน *STX16* ลดลง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง ไม่พบความต่างของทั้ง 2 กลุ่ม (แสดงในภาพที่ 4.15) และเมื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนไวรัส VP28 ซึ่งเป็นยีนที่พบมากที่สุด ในไวรัสตัวแดงดวงขาว จากผลการทดลองพบว่า หลังกุ้งติดโรคตัวแดงดวงขาว ที่เวลา 24 ชั่วโมง ในเหงือกกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *STX16* พบว่ามี การแสดงออกของยีนไวรัส VP28 เพิ่มมากขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (แสดงในภาพที่ 4.16)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.15 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *STX16* ในเหงือกกึ่งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว

- a. : การแสดงออกของยีน *STX16* ในเหงือกกึ่งที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาว ที่เวลา 24 ชั่วโมง
- b. : การแสดงออกของยีน *STX16* ในเหงือกกึ่งที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาว ที่เวลา 48 ชั่วโมง

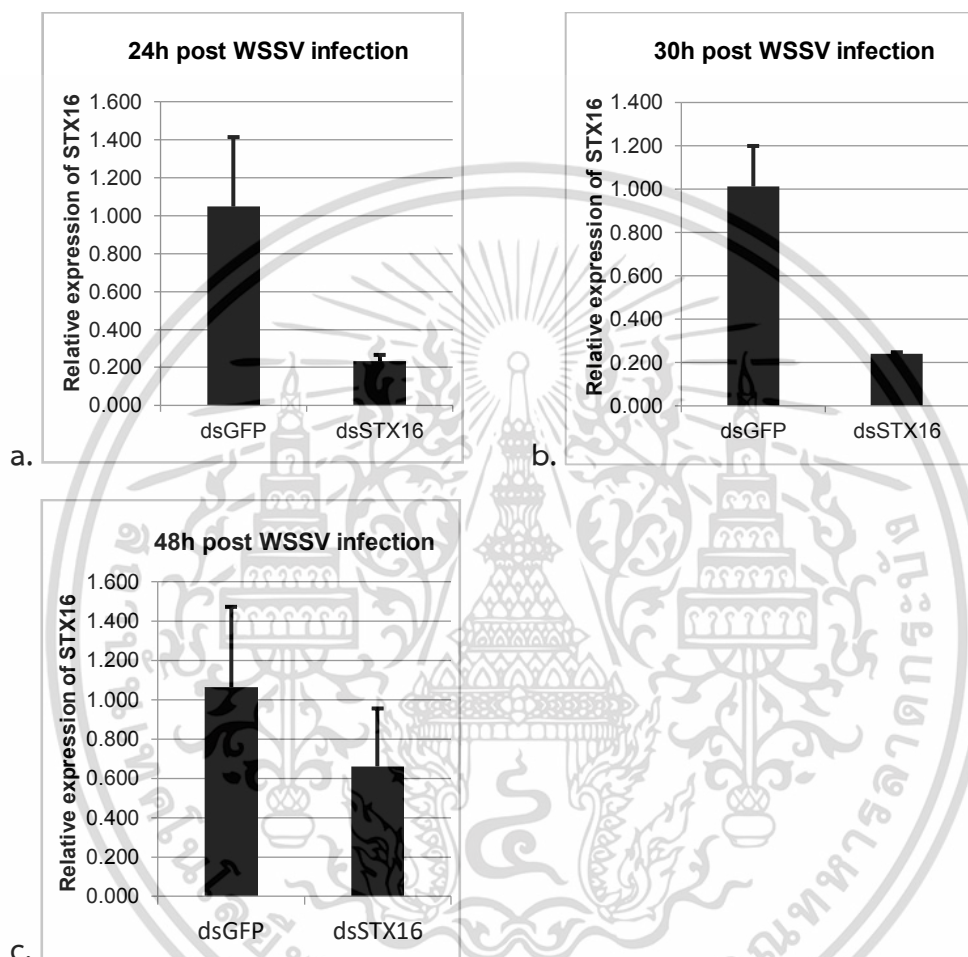


ภาพที่ 4.16 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *VP28* ในเหงือกของกึ่งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว

- a. : การแสดงออกของยีน *VP28* ในเหงือกกึ่งที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาว ที่เวลา 24 ชั่วโมง
- b. : การแสดงออกของยีน *VP28* ในเหงือกกึ่งที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาว ที่เวลา 48 ชั่วโมง

และนอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาบทบาทของยีน *STX16* ในเลือดของกึ่ง โดยทำการเก็บเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ตัวอย่างเลือดกึ่งหลังติดโรคตัวแดงดวงขาวที่เวลา 24 30 และ 48 ชั่วโมง และตรวจสอบการแสดงออกไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

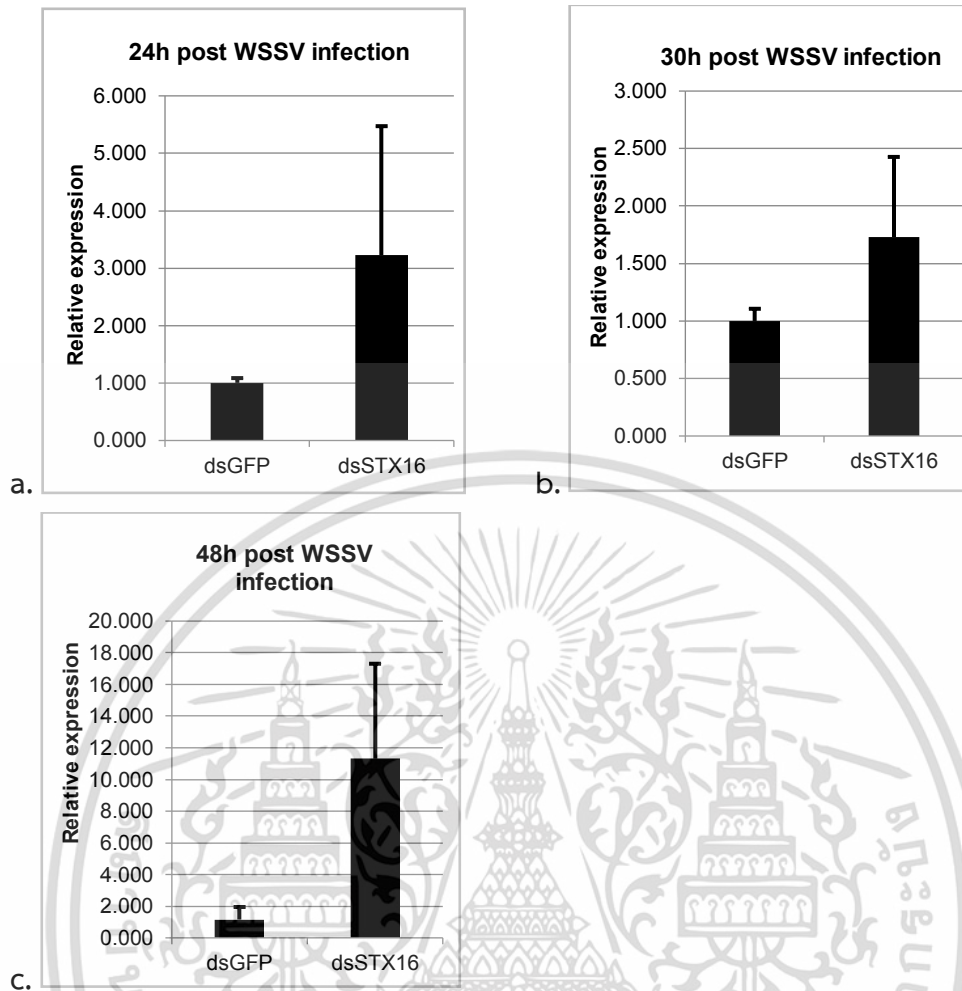
ของยีน *STX16* ด้วยเทคนิค qPCR พบว่าหลังกึ่งติดโรคตัวแดงดวงขาวที่ 24 30 และ 48 ชั่วโมง ในเลือดกึ่งกลุ่มที่ฉีดด้วย ds*STX16* มีการแสดงออกของยีน *STX16* ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (แสดงในภาพที่ 4.17) และเมื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *VP28* ในเลือดของกึ่ง จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ในกึ่งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *STX16* มีการแสดงออกของยีน *VP28* เพิ่มมากขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (แสดงในภาพที่ 4.18)



ภาพที่ 4.17 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *STX16* ในเลือดของกึ่งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว

- : การแสดงออกของยีน *STX16* ในเลือดกึ่งที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาว ที่เวลา 24 ชั่วโมง
- : การแสดงออกของยีน *STX16* ในเลือดกึ่งที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาว ที่เวลา 30 ชั่วโมง
- : การแสดงออกของยีน *STX16* ในเลือดกึ่งที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาว ที่เวลา 48 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



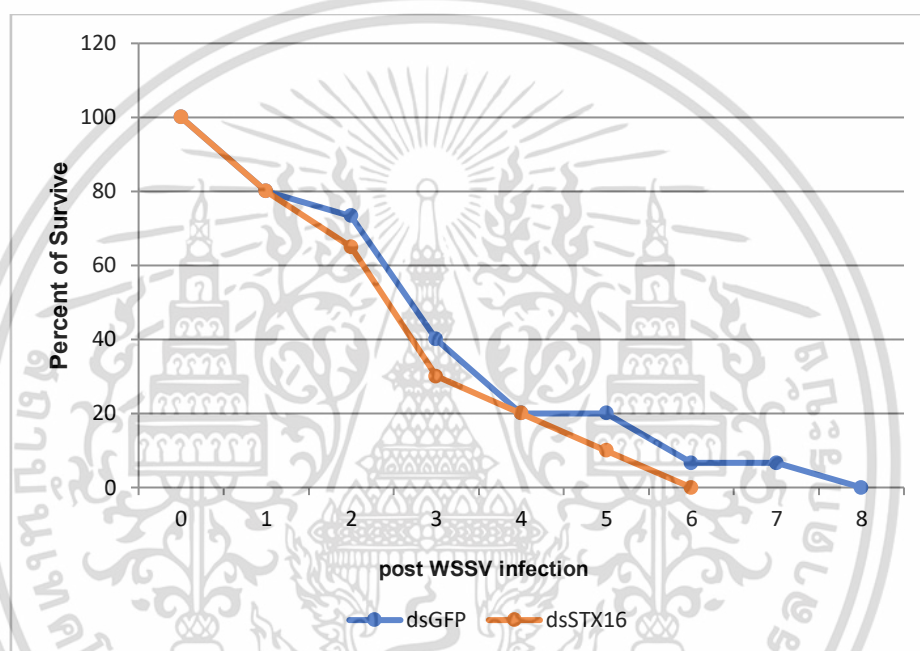
ภาพที่ 4.18 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *VP28* ในเลือดกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *STX16* ในเลือดกุ้งที่ติดโรควิวตัวแดงดวงขาว

- a. : การแสดงออกของยีน *VP28* ในเลือดกุ้งที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาว ที่เวลา 24 ชั่วโมง
- b. : การแสดงออกของยีน *VP28* ในเลือดกุ้งที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาว ที่เวลา 30 ชั่วโมง
- c. : การแสดงออกของยีน *VP28* ในเลือดกุ้งที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาว ที่เวลา 48 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6.2 การติดตามอัตราการตายของกุ้ง

จากการติดตามอัตราการตายของกุ้งที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาว ทั้งในกุ้งกลุ่มควบคุม และในกุ้งกลุ่มที่ยับยั้งการแสดงออกของยีน *STX16* เป็นเวลา 8 วัน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากุ้งกลุ่มที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *STX16* จะมีอัตราการตาย 100 % ที่ 6 วัน หลังจากติดไวรัสตัวแดงดวงขาว และกุ้งกลุ่มควบคุมจะมีอัตราการตาย 100 % ที่ 8 วันหลังจากติดไวรัสตัวแดงดวงขาว (แสดงในภาพที่ 4.19) ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่ากุ้งกลุ่มที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *STX16* จะมีอัตราการตายสะสมเร็วกว่ากุ้งกลุ่มควบคุม

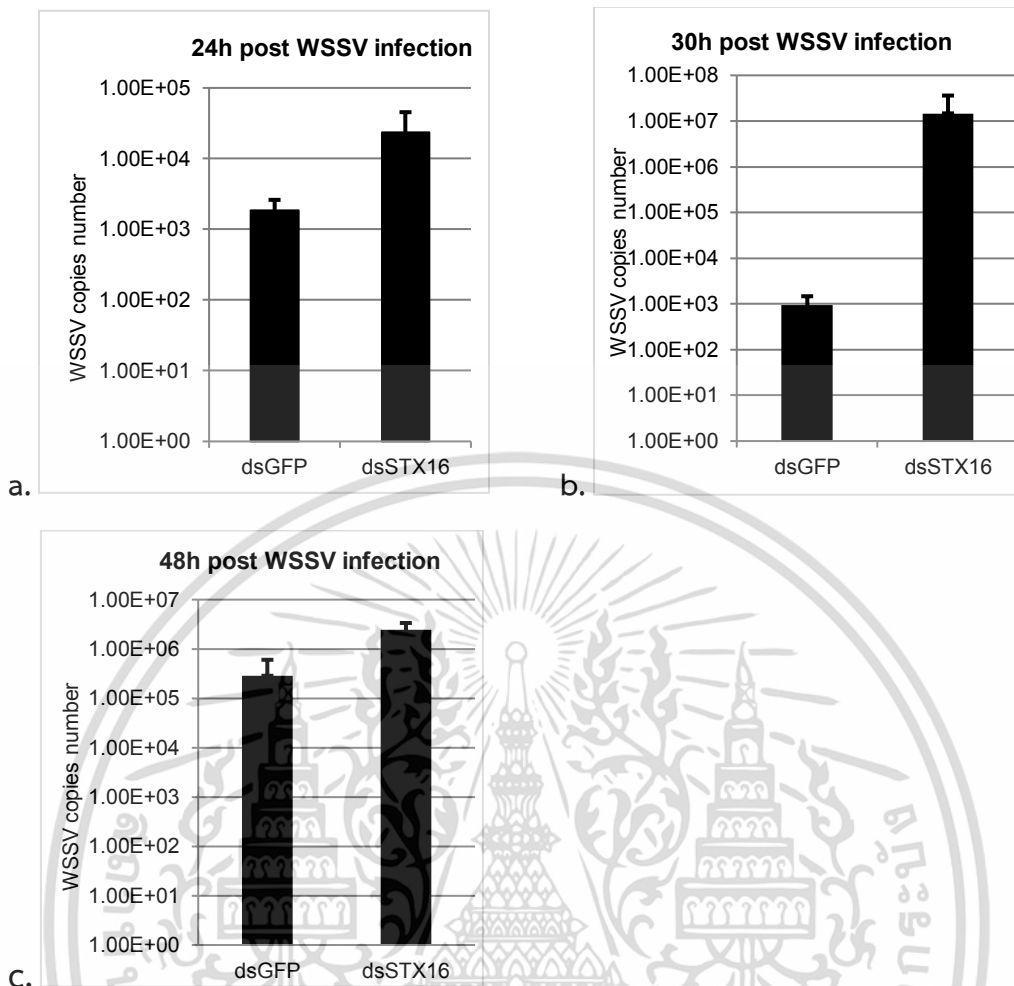


ภาพที่ 4.19 แสดงผลอัตราการอยู่รอดของกุ้งที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาว เมื่อถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *STX16* ด้วย dsSTX16 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

4.6.3 การตรวจสอบปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV copies number)

จากผลการตรวจสอบปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV copies number) ที่เวลา 24 30 และ 48 ชั่วโมง พบว่ากุ้งกลุ่มที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *STX16* มีปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาวเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (แสดงในภาพที่ 4.20)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.20 แสดงผลการตรวจสอบปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV copies number) ในกุ้ง หลังติดโรคตัวแดงดวงขาว

- : ปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาว ในกุ้งหลังติดไวรัสตัวแดงดวงขาว ที่เวลา 24 ชั่วโมง
- : ปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาว ในกุ้งหลังติดไวรัสตัวแดงดวงขาว ที่เวลา 30 ชั่วโมง
- : ปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาว ในกุ้งหลังติดไวรัสตัวแดงดวงขาว ที่เวลา 48 ชั่วโมง

จากการทดลองพบว่าเมื่อทำการยับยั้งการแสดงออกของยีน *STX16* ในกุ้งที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาว จะทำให้ปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาวเพิ่มมากขึ้น โดยคาดว่าอาจเกิดจากยีน *STX16* มีส่วนช่วยในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้ง จากการศึกษที่ผ่านมาพบว่ายีน *STX16* มีส่วนช่วยทำลายองค์ประกอบที่เสื่อมสภาพ หรือสิ่งแปลกปลอม ในกระบวนการออโตฟาจี ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับผลการทดลองนี้ และยังพบว่ายีน *STX17* สามารถแทนที่ยีน *STX16* ในกระบวนการออโตฟาจีได้ เนื่องจากทำหน้าที่เหนี่ยวนำไลโซโซมให้เข้ามาจับกับออโตฟาโกโซม เช่นเดียวกัน (Tang, 2019) จากการศึกษที่ผ่านมาได้ทำการยับยั้งการแสดงออกของยีน *STX17* ในเซลล์ไวรัสตับอักเสบซี HCV ซึ่งพบว่าเมื่อทำการยับยั้งการแสดงออกของยีน *STX17* ทำให้ปริมาณไวรัสมีอัตราเพิ่มสูงขึ้น (Ren et al., 2016) ซึ่งสอดคล้องกันกับการทดลอง

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการค้นหาและวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมของยีน *STX16* ในกุ้งขาวพบ accession number XM_027350891.1 และมีบริเวณ open reading frame ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 918 bp ซึ่งสามารถ translate เป็นกรดอะมิโน 305 ตัว (จากผลที่แสดงในหัวข้อ 4.1) และพบว่ามี 3 conserved domain คือ coiled coil, t_SNARE และ Transmembrane region และจากแผนภูมิความสัมพันธ์ของ *STX16* พบว่ามีความเหมือนกับกุ้งกุลาดำมากที่สุด จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *STX16* ในเนื้อเยื่อกุ้งปกติ พบว่าการแสดงออกมากที่สุดที่เหงือก (Gill) และเมื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *STX16* ในกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาวพบว่ายีน *STX16* มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นทั้งในเลือดและในเหงือกของกุ้ง จากผลการทดลองนี้พบว่าการแสดงออกของยีน *STX16* มีความเกี่ยวข้องกับการติดโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้ง ดังนั้นจึงทำการศึกษาบทบาทของยีน *STX16* ในกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว ด้วยเทคนิค RNA interference พบว่าอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับยีน *STX16* หรือ ds*STX16* ที่ความเข้มข้น 1 µg/g shrimp สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *STX16* ได้ และเมื่อทำการยับยั้งการแสดงออกของยีน *STX16* ในกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว พบว่าการแสดงออกของยีนไวรัส VP28 เพิ่มมากขึ้น จากนั้นได้มีการตรวจสอบปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV copy number) พบว่ากุ้งกลุ่มที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *STX16* มีปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาวเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และจากผลการตรวจสอบอัตราการตาย พบว่ากุ้งกลุ่มที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *STX16* หลังติดโรคตัวแดงดวงขาว มีอัตราการตาย 100% ที่เร็วกว่ากลุ่มควบคุม

จากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่ายีน *STX16* มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้ง การแสดงออกที่ลดลงของยีน *STX16* ส่งผลให้กุ้งติดโรคตัวแดงดวงขาวมากขึ้น เพราะฉะนั้นการพัฒนาสารต้านไวรัส (antiviral agent) ที่มีรูปแบบเป็นการเพิ่มการแสดงออกของยีน *STX16* เพื่อช่วยในการลดปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาว และเพิ่มอัตราการรอดของกุ้ง ก็อาจเป็นแนวทางหนึ่งในการยับยั้งการแพร่ระบาดของโรคตัวแดงดวงขาวในอุตสาหกรรมกุ้งได้ ซึ่งในส่วนนี้จะต้องทำงานวิจัยเพิ่มเติมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองพบว่ามีบางการทดลองยังต้องทำการทดลองซ้ำ โดยการเพิ่มจำนวนสัตว์ทดลอง (กึ่ง) เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่มีค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จากการคำนวณทางสถิติ และเนื่องจากยังไม่สามารถทำการทดลองที่ต้องใช้สัตว์ทดลองเพิ่มเติมในช่วงการทำโปรเจกต์ได้ เพราะมีการปรับปรุงบริเวณเลี้ยงสัตว์ทดลอง แต่จากผลการทดลองที่ได้แสดงข้างต้น ก็สามารถสรุปแนวโน้มบทบาทของยีน *STX16* ในกึ่งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว ซึ่งใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการทำวิจัยต่อไปได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, et al., 2001. Role of bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.
- Chen, Y.H., Yuan, F.H., Bi, H.T., Zhang, Z.Z., Yue, H.T., Yuan, K., Chen, Y.G., Wen, S.P. and He, J.G., 2016. Transcriptome analysis of the unfolded protein response in hemocytes of *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 54, 153–163.
- Chou, H.Y., Huang, C.Y., Wang, C.H., Chiang, H.C. and Lo, C.F., 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Dis. Aquat* 23, 165-173.
- Delgado, M., Singh, S., De, S., Haro, S., Master, M., Ponpuak, C., Dinkins, W., Ornatowski, I., Vergne, V. and Deretic., 2009. Autophagy and pattern recognition receptors in innate immunity. *Immunol. Rev.* 227, 189-202.
- Hansen, M., Rubinsztein, D.C. and Walker, D.W., 2018. Autophagy as a promoter of longevity. *insights from model organisms.* 19, 579.
- Hu, B., Zhong, L., Weng, Y., Peng, L., Huang, Y., Zhao, Y. and Liang, X., 2020. Therapeutic siRNA: state of the art. *Signal Transduction and Targeted Therapy.* 5, 101.
- Jaree, P., Boonchuen, P., Thawonsuwan, J., Kondo, H., Hirono, I. and Somboonwiwat K., 2022. Transcriptome profiling reveals the novel immunometabolism-related genes against WSSV infection from *Fenneropenaeus merguensis*. *Fish and Shellfish Immunology* 120, 31-44.
- Jiana, J.T., Liua, L.K. and Liua, H.P., 2022. Autophagy and white spot syndrome virus infection in crustaceans. *Fish and Shellfish Immunology Reports* 3, 100047.
- Lee Y, Ahn C, Han J, et al., 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415-419.
- Lightner, D.V., 1996. A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. *World Aquaculture Soc. Baton Rouge.* Section 3, 11.
- Martines, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., et al., 2002. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage RNAi. *Cell* 110, 563-574.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Mendoza-Cano, F. and Sanchez-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*. 10, 1–11.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M. and Klionsky, D.J., 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *NIH Public Access Author Manuscript*. 28, 451(7182): 1069–1075.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29, 9.
- Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N. and Filipowicz W., 2007. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends in Cell Biology* 17, 118-6126.
- Raico, E., Lamela, L., Silveira, R. and Martinez, M., 2003. Actividad peroxidasa (POD) en juveniles del camarón *Litopenaeus schmitti* II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura (CIVA). 99-104.
- Ren, H., Elgner, F., Jiang, B., Himmelsbach, K., Medvedev, R., Ploen, D. and Hildt, E., 2016. The Autophagosomal SNARE Protein Syntaxin 17 Is an Essential Factor for the Hepatitis C Virus Life Cycle. *Journal of Virology*. 90, 13.
- Schiavo, G., Stenback, G., Rothman, J. and Sollner, T., 1997. Binding of the synaptic vesicle v-SNARE, synaptotagmin, to the plasma membrane t-SNARE, SNAP-25, can explain docked vesicles at neurotoxin-treated synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 997–1001.
- Soderhall, K. and Cerenius, L., 1992. Crustacean immunity. *Annual Review of Fish Diseases*. 2, 3-23.
- Suttle, C.A., 2007. Marine viruses: major players in the global ecosystem, *Nature Reviews Microbiology*. 5, 801–812.
- Tang, B.L., 2019. Syntaxin 16's Newly Deciphered Roles in Autophagy. *Cells*. 8, 1655
- Tang, B.L., Low, D.Y., Lee, S.S., Tan, A.E., and Hong, W., 1998. Molecular cloning and localization of human syntaxin 16, a member of the syntaxin family of SNARE proteins. *Biochemistry and Biophysics Research Communications*. 242, 673-679.
- Tassanakajona, A., Rimphanichyakita, V., Visetnana, S., Amparyupb, P., Somboonwiwata, K., Charoensapsrib, W. and Tang, S., 2017. Shrimp humoral responses against pathogens: antimicrobial peptides and melanization
- Virgin, H.W. and Levine, B., 2009. Autophagy genes in immunity. *Nature Immunology* 10 461-
- เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Wang, W. and Zhang, X., 2008. Comparison of antiviral efficiency of immune responses in shrimp. *Fish & Shellfish Immunology* 25, 522–527
- Wilson, R. and Doudna, J., 2013. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu Rev Biophys.* 42, 217–239
- Xie, X., Li, H., Xu, L. and Yang, F., 2005. A simple and efficient method for purification of intact white spot syndrome virus (WSSV) viral particles. *Virus Res.* 108 (1–2), 63–67.
- Zhao, C., Peng, C., Wang, P., Yan, L., Fan, S. and Qiu, L., 2021. Identification of a Shrimp E3 Ubiquitin Ligase TRIM50-Like Involved in Restricting White Spot Syndrome Virus Proliferation by Its Mediated Autophagy and Ubiquitination. *frontiers in Immunology.* 12, 682562.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Luria-Bertani broth (LB broth)

0.5% w/v NaCl	1.5	กรัม
0.5% w/v Yeast extract	1.5	กรัม
1.0% w/v Peptone	3.0	กรัม

2. Luria-Bertani agar (LB agar)

0.5% w/v NaCl	1.5	กรัม
0.5% w/v Yeast extract	1.5	กรัม
1.0% w/v Peptone	3.0	กรัม
1.5% w/v Agar	6.0	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. 70 % Ethanol

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

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

วิธีการเตรียม

ผสมเอทานอลความเข้มข้น 95% ปริมาตร 737 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่นปริมาตร 263 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน

2. 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

3. Elution Buffer

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



งานบัณฑิตศึกษาคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ 21 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2565

ข้าพเจ้า นางสาวพิชชากร หมัดประเสริฐ รหัสประจำตัว 62050628

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา จุลชีววิทยา ภาควิชา ชีววิทยา
ขอรับรองว่าสหกิจศึกษา เรื่อง

ชื่อภาษาไทย การศึกษาบทบาทของยีน STX16 ในกิ้งกือที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว

ชื่อภาษาอังกฤษ The role of STX16 in *Penaeus vannamei* upon WSSV infection

ปีการศึกษา 2565

เป็นผลงานวิจัยของข้าพเจ้าแต่เพียงผู้เดียวโดยมิได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการ
ตรวจสอบความซ้ำซ้อนโดยใช้โปรแกรมเรียบร้อยแล้วและได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียน
งานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากวิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์แล้วโปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 2.44 %

ลงชื่อ.....นางสาว พิชชากร หมัดประเสริฐ.....

(นางสาวพิชชากร หมัดประเสริฐ)

นักศึกษา

ข้าพเจ้า ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ อาจารย์ที่ปรึกษาสหกิจศึกษาได้ตรวจสอบสหกิจศึกษาของนักศึกษา
ข้างต้นแล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็น
หลักฐาน

ลงชื่อ.....Khanningsan Klantit.....

(ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์)

อาจารย์ที่ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้