

การศึกษาหาชนิดของโปรตีนอาร์โกนาท (Argonaute)  
ที่มีการแสดงออกตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งกลางดำ  
ที่ได้รับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน CpG oligodeoxynucleotides (CpG ODNs)

THE IDENTIFICATION OF ARGONAUTE PROTEIN THAT RESPONSE TO  
WHITE SPOT SYNDROME VIRUS INFECTION  
AFTER IMMUNE-STIMULATION  
BY CpG OLIGODEOXYNUCLEOTIDES (CpG ODNs)

วันทนา ลีบอน้อย<sup>1\*</sup>, เจนจิรา เจริญจิตร<sup>1</sup>, ธัญวรรณ แซ่เอี้ยว<sup>1</sup> และ อภินันท์ อุดมกิจ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร กรุงเทพมหานคร 10220

<sup>2</sup>สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา นครปฐม 73170

Wantana Leebonoi<sup>1\*</sup>, Jenjira Charoenjit<sup>1</sup>, Thanyawan Saeaiw<sup>1</sup> and Apinunt Udomkit<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Science and technology, Phranakorn Rajabhat University,  
Bangkok, 10220

<sup>2</sup>Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Salaya Campus,  
Nakhon Pathom, 73170

\*E-mail: wasabi\_am@hotmail.com

Received: 2019-08-03

Revised: 2019-09-28

Accepted: 2020-01-22

### บทคัดย่อ

กึ่งกลางดำประสบปัญหาโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวทำให้ผลผลิตลดลงซึ่งมีผลกับเกษตรกรอย่างมาก การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนอาร์โกนาทที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งกลางดำที่ได้รับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันหลังการติดเชื้อ ด้วยการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในปริมาณที่ทำให้กึ่งกลางดำตายในวันที่ 3 แล้วตรวจสอบการแสดงออกของยีนอาร์โกนาทในกึ่งกลางดำที่ได้รับอาหารที่ผสมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน CpG ODNs เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับอาหารที่ผสมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยมีกลุ่มไม่ติดเชื้อเป็นกลุ่มควบคุม พบว่าระดับของยีนอาร์โกนาทชนิดที่ 1 และ 2 (PmAgo1 และ PmAgo2) ในกลุ่มที่ติดเชื้อและกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อ แต่ได้รับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน CpG มีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบ

กับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารกระตุ้น ในขณะที่ระดับการแสดงออกของยีนอาร์โกนาทชนิดที่ 3 (PmAgo3) ในกลุ่มที่ติดเชื้อและได้รับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันไม่แตกต่างจากกลุ่มการทดลองอื่น ผลจากการวิจัยครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า PmAgo1 และ PmAgo2 อาจมีบทบาทสำคัญในกระบวนการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ โดยสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน CpG อาจจะไปมีผลกระตุ้นภูมิคุ้มกันวิธีอื่น ๆ ที่มีส่วนช่วยในการทำงานของโปรตีนอาร์โกนาทสองชนิดนี้

**คำสำคัญ:** โปรตีนอาร์โกนาท สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน CpG ODNs ไวรัสตัวแดงดวงขาว กุ้งกุลาดำ

### ABSTRACT

Black tiger shrimp encountered white spot syndrome disease which leads to a drastic loss in shrimp production affected to shrimp farmer. This study aims to search for the Argonaute proteins that expressed responsively to WSSV infection in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). The black tiger shrimp obtains CpG ODNs immune-stimulation after WSSV injection at virus dilution cause they died after 3 days post-injection (dpi) and the expression level of Argonaute proteins upon WSSV infection were investigated. The expression level of Argonaute proteins were examined in CpG ODNs immune-stimulation shrimp compared to no immune-stimulation shrimp and non-infection shrimp. The expression level of PmAgo1 and PmAgo2 of *P. monodon* in CpG ODNs immune-stimulation shrimp significantly decreased ( $p < 0.05$ ) when compared to no immune-stimulation shrimp, whereas the expression level of PmAgo3 in infection shrimp and immune-stimulation shrimp was not significantly different from the other group ( $p > 0.05$ ). Therefore, this study indicated that the Argonaute protein of *P. monodon*, PmAgo1 and PmAgo2 have an important role in white spot syndrome virus infection in CpG ODNs immunity stimulation *P. monodon*. The CpG ODNs might stimulate the immunity in white spot syndrome virus infection black tiger shrimp thus it helps shared the heavy task of these two Argonaute proteins.

**Keywords:** Argonaute protein, immuno stimulant CpG ODNs, white spot syndrome virus, Black tiger shrimp, *Penaeus monodon*

### บทนำ

กุ้งกุลาดำเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย แต่ในปัจจุบันกำลังประสบปัญหาโรคหลายชนิด หนึ่งในนั้นคือ โรคตัวแดงดวงขาว หรือ white spot syndrome disease ที่มีสาเหตุจากไวรัส

ตัวแดงดวงขาว (WSSV) ที่พบในกุ้งทะเลรวมถึงกุ้งกุลาดำและสร้างความเสียหายให้กับเกษตรกร โดยส่งผลให้ผลผลิตลดลงและยังส่งผลต่ออุตสาหกรรมการผลิตกุ้งเพื่อการบริโภคทั้งภายในประเทศ การส่งออกเป็นอย่างมาก (Lightner, 1996) เนื่องจากโรคนี้จะทำให้กุ้งมีอัตราการตายสูงถึง 80-100% ภายใน 3-5 วันหลังการติดเชื้อ

กุ้งมีระบบภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสซึ่งเป็นระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดตอบสนองแบบไม่เฉพาะเจาะจงและไม่มีแอนติบอดีที่สามารถจดจำสิ่งแปลกปลอมแล้วสร้างภูมิคุ้มกันมาทำซ้ำในครั้งต่อไป (Li & Xiang, 2013) กระบวนการอาร์เอ็นเออินเตอร์เฟอเรนซ์ หรืออาร์เอ็นเอไอ (RNAi) เป็นกระบวนการยับยั้งการแสดงออกของยีนโดยใช้อาร์เอ็นเอสายคู่ (dsRNA) เป็นตัวกลาง และเป็นหนึ่งในระบบภูมิคุ้มกันที่ช่วยให้กุ้งมีความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัส โดยมีโปรตีนอาร์โกนาท (Argonaute) เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการ ปัจจุบันมีการค้นพบโปรตีนในกลุ่มของ Argonaute ในกุ้งกุลาดำจำนวน 5 ชนิด แบ่งเป็น AGO ซับแฟมิลี ได้แก่ PmAgo1-4 และ PIWI ซับแฟมิลี ได้แก่ PmPiwi โดย Argonaute ทั้ง 5 ชนิดที่พบในกุ้งกุลาดำนี้ทำหน้าที่แตกต่างกันไป โดย PmAgo1 ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ RNAi และมีการแสดงออกที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง (YHV) (Dechklar et al., 2008, Unajak et al., 2006) ในขณะที่ PmAgo2 มีการแสดงออกที่ตอบสนองต่อทั้งแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ WSSV (Yang et al., 2014) PmAgo3 มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการ RNAi และการเพิ่มจำนวน YHV ในกุ้ง (Phetrungnapa et al., 2013) นอกจากนี้พบว่ากระบวนการยับยั้งการแสดงออกของ PmAgo1 และ PmAgo3 ด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะมีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อ YHV และการยับยั้งการแสดงออกของ PmAgo3 ยังมีผลต่อการติดเชื้อ WSSV และทำให้กุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตายช้าลง ดังนั้น PmAgo1 และ PmAgo3 จึงมีหน้าที่ในกระบวนการ RNAi ที่มีอาร์เอ็นเอสายคู่เป็นตัวกลางและมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มจำนวนของไวรัสในกุ้ง (Ho et al., 2019) PmAgo4 เป็นโปรตีนที่มีลักษณะเหมือน AGO ซับแฟมิลี แต่พบที่มีการแสดงออกเฉพาะในเซลล์สืบพันธุ์และทำหน้าที่เกี่ยวกับยับยั้งการแสดงออกของ transposons เหมือนโปรตีนใน PIWI ซับแฟมิลี (Leebonoi et al., 2015) นอกจากนี้โปรตีน PIWI ตัวแรกที่ถูกค้นพบในกุ้งกุลาดำ (PmPiwi1) มีการแสดงออกสูงในรังไข่และอวัยวะ เมื่อยับยั้งการแสดงออกของ PmPiwi1 พบว่ามีระดับการแสดงออกของ transposons ที่สูงขึ้นในอวัยวะของกุ้ง PmPiwi1 มีหน้าที่ในกระบวนการสร้างอสุจิเนื่องจากเมื่อยับยั้งการแสดงออกของ PmPiwi1 พบว่ามีการสร้างอสุจิลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Sukthaworn et al., 2019) ในงานวิจัยนี้ได้เลือกศึกษาเฉพาะโปรตีนอาร์โกนาท ในกลุ่ม AGO ซับแฟมิลี ได้แก่ PmAgo1 PmAgo2 และ PmAgo3 เนื่องจากเป็นโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัส

สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน CpG oligodeoxynucleotide (CpG ODNs) เป็นดีเอ็นเอของโปรคาริโอตที่ไม่มีการเติมหมู่เมทิลสามารถสกัดได้จากแบคทีเรีย มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันในเซลล์ยูคาริโอต (Milutinovi & Kurtz, 2016) CpG เป็นชนิดของโมเลกุลที่จับกับเชื้อโรค (PAMPs) ซึ่งเป็น

สารเสริมฤทธิ์ชนิดใหม่ที่จะไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด โดยจะไปจับกับ Toll-like receptor โดยพบว่า CpG ODNs จะทำงานร่วมกับ LvToll1 และ LvToll3 รวมทั้งเอนโดโซมในเม็ดเลือดของ กุ้งขาวแวนนาไมส่งผลให้มีการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (Sun et al., 2014) นอกจากนี้ CpG ODNs ยังกระตุ้นปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการการต้านไวรัส เช่น Dicer, Argonaute, STAT and ROS ในกุ้งขาวแวนนาไมอีกด้วย (Zhang et al., 2010)

ในการศึกษาครั้งนี้ต้องการหาชนิดของโปรตีนอาร์โกนอทในกุ้งกุลาดำที่มีระดับการแสดงออกตอบสนองต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวในสภาวะที่ได้รับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน CpG ODNs เพื่อให้ทราบถึงกลไกการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของ CpG ODNs ในกุ้งกุลาดำ

## วิธีการ

### 1. การเตรียมตัวอย่างกุ้งกุลาดำ

กุ้งที่ใช้ในการทดลอง คือ กุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) ปลอดไวรัสตัวแดงดวงขาว ขนาด 5-10 กรัมจากบ่อเลี้ยงกุ้งของเกษตรกรในอำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี โดยนำกุ้งใส่ในถังพลาสติกขนาด 1,000 ลิตร ที่บรรจุน้ำเค็มเพื่อขนส่งกุ้งมายังสถานที่ปฏิบัติการ ณ ฟาร์มมานพ ตำบลห้วงน้ำขาว อำเภอเมือง จังหวัดตราด หลังจากนั้นพักกุ้งไว้ในถังพักที่มีการให้ออกซิเจนเป็นเวลา 1 วันเพื่อรอทำการทดลองในขั้นต่อไป

### 2. การตรวจสอบปริมาณไวรัสที่มีผลให้กุ้งกุลาดำตายเฉียบพลันในวันที่ 3 และการตรวจสอบไวรัสตัวแดงดวงขาวในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำหลังการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

กุ้งที่ปลอดเชื้อถูกแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 5-8 ตัว ได้แก่ กลุ่มที่ฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ทำให้เชื้อจาง  $1 \times 10^{-1}$   $1 \times 10^{-2}$   $1 \times 10^{-3}$   $1 \times 10^{-4}$  เท่า และกลุ่มควบคุมที่ฉีด 150 mM NaCl ตามลำดับ โดยฉีดไวรัส(ไวรัสตัวแดงดวงขาว)ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.เฉลิมพร อังศวานันท์ มหาวิทยาลัยมหิดล) 50  $\mu$ l ด้วยเข็มฉีดยาขนาด 29 G  $\times$   $\frac{1}{2}$ " (0.33 mm  $\times$  12.7 mm) เข้าบริเวณกล้ามเนื้อด้านหลังใต้เปลือกที่ 2 จากส่วนหัวของกุ้งกุลาดำ ทำการสังเกตและบันทึกจำนวนกุ้งที่ตายเพื่อหาร้อยละอัตราการตายสะสมและเก็บเนื้อเยื่อเหงือกของกุ้งที่ตายเพื่อตรวจสอบไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยวิธี RT-PCR

นำเนื้อเยื่อเหงือกของกุ้งมาสกัดอาร์เอ็นเอด้วย Tri-reagent ตามที่ระบุในคู่มือการใช้งานของ VWR Life Science RiboZol™ จากนั้นใช้อาร์เอ็นเอที่สกัดได้เป็นแม่แบบสำหรับการสังเคราะห์ cDNA สายแรก โดยนำอาร์เอ็นเอต้นแบบปริมาณ 1  $\mu$ g ผสมกับ ไพรเมอร์ Oligo-dT<sub>15</sub> ในปริมาณ 500 nM โดยใช้ เอนไซม์ Improm-II™ Reverse-Transcriptase (Promega, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 5 นาที 42 °C เป็นเวลา 60 นาที และ 70 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำ cDNA ที่สร้างได้ ปริมาณ 50 ng มาเป็นดีเอ็นเอตั้งต้นสำหรับการเพิ่มปริมาณ transcript ของ ยีน vp28 ของไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสซึ่งประกอบด้วย 1  $\times$  Taq DNA

polymerase buffer with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 mM  $\text{MgCl}_2$  50 nM ของ dNTP แต่ละตัว 1 Unit *Taq* DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific) 0.2  $\mu\text{M}$  ของไพรเมอร์ VP28-3 และ 0.2  $\mu\text{M}$  ของไพรเมอร์ VP28-4 (ตารางที่ 1) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 4 นาที 1 รอบ จากนั้นทำปฏิกิริยาที่ 95 °C เป็นเวลา 30 วินาที 55 °C 30 วินาที และ 72 °C 30 วินาที จำนวน 25 รอบ และรอบสุดท้ายที่ 72 °C เป็นเวลา 2 นาที โดยทำการเพิ่มจำนวนยีน actin ของกิ้งกูด้าเป็นยีนควบคุมที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังนี้ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที 55 °C 30 วินาที และ 72 °C 45 วินาที จำนวน 21 รอบ และรอบสุดท้ายที่ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ผสมสารเรืองแสง Midori Green Advanced (NIPPON Genetics Europe) 4-6  $\mu\text{l}$

### 3. การทดสอบผลของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน CpG ODNs หลังการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกิ้งกูด้า

การทดลองนี้แบ่งกิ้งกูด้า 40 ตัว ออกเป็นสองกลุ่มใหญ่คือกลุ่มที่ฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ความเจือจาง  $1 \times 10^{-3}$  20 ตัว และกลุ่มที่ฉีด 150 mM NaCl 20 ตัว โดยแต่ละกลุ่มใหญ่จะทดสอบผลการให้อาหารกิ้งต่างกันสองชนิดคืออาหารเม็ดปกติ 10 ตัว และอาหารผสมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน CpG ODNs 10 ตัว โดยเตรียมได้จากนำอาหารเม็ดผสม 0.02 % (w/w) ของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ปริมิคซ์ CpG ODNs (THAIVA CHAROEN INDUSTRIES Co., LTD.) ของอาหารเม็ด โดยจะคำนวณให้เท่ากันทุกบ่อและให้อาหารตามเวลาที่กำหนด ได้แก่ เวลา 06.00 น. 11.00 น. และ 17.00 น. เป็นเวลา 3 วันหลังการฉีดเชื้อ หลังจากนั้นจะนำเนื้อเยื่อเหงือกมาตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนอาร์โกนาท (Argonaute) ของกิ้งกูด้า

### 4. การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนอาร์โกนาท (Argonaute) ของกิ้งกูด้า หลังการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

นำเนื้อเยื่อเหงือกจากการทดสอบผลของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน CpG ODNs หลังการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกิ้งกูด้ามาศึกษาความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน PmAgo1-3 ในกิ้งกูด้าที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี multiplex-PCR ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนอาร์โกนาทแต่ละชนิด โดยใช้ cDNA ที่สังเคราะห์จากอาร์เอ็นเอของเหงือกกิ้ง เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และทำปฏิกิริยา multiplex-PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ transcript ของ PmAgo1 และ PmActin ซึ่งประกอบด้วย 1  $\times$  *Taq* buffer with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 mM  $\text{MgCl}_2$  50 nM ของ dNTP แต่ละชนิด 1 Unit ของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific) และ 0.2  $\mu\text{M}$  ของไพรเมอร์ AGO-Amp 0.2  $\mu\text{M}$  5'AGOR1 0.012  $\mu\text{M}$  PmActinF และ 0.012  $\mu\text{M}$  PmActinR โดยบ่มที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 3 นาที 1 รอบ และทำปฏิกิริยาที่ 94 °C 30 วินาที 60 °C 30 วินาที และ 72 °C 30 วินาที เป็นจำนวน 2 รอบ ตามด้วยปฏิกิริยาลูโซที่ 94 °C 30 วินาที 55 °C 30 วินาที 72 °C 30 วินาที จำนวน 28 รอบ และอุณหภูมิสุดท้ายที่ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที วิเคราะห์การแสดงออกของยีนอาร์โกนาทด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิส

ตารางที่ 1 ลำดับไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

ชื่อไพรเมอร์	จำนวนเบส (base)	ลำดับ 5' → 3'	การทดลอง
VP28-3	22	ATGAGAATGAACTCCACCTTAA	การตรวจสอบไวรัสตัวแดงดวงขาว ในเนื้อเยื่อกิ่งกุลาดำหลังการฉีด เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว
VP28-4	22	CAGAGCCTAGTCTATCAATCAT GACTCGTACGTGGGCGACGAG	
PmActinF	21	AGCAGCGGTGGTTCATCTCCTGCTC	การตรวจสอบไวรัสตัวแดงดวงขาว ในเนื้อเยื่อกิ่งกุลาดำหลังการฉีด เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและการ ตรวจสอบการแสดงออกของยีน อาร์โกนาท (Argonaute) ของ กิ่งกุลาดำหลังการฉีดเชื้อไวรัส ตัวแดงดวงขาว
PmActinR	24	CAAGAATTTGGTCTGACGATC	
AGO-Amp	21	GTGAAGCGTGTGGGTGACACTG	การตรวจสอบการแสดงออก ของยีนอาร์โกนาท (Argonaute) ของกิ่งกุลาดำหลังการฉีดเชื้อไวรัส ตัวแดงดวงขาว
5'AGOR1	22	GATTGGTGAACAAACAATGTC	
N-PmAGO2F1	22	CTGCGAATCGCTGACACCATC	
N-PmAGO2R1	21	GGTGAAGGATTTCCCACTT	
PmAGO3F	20	CACTGGGGAGTGAGTTGCTT	
PmAGO3R	20		

การวัดระดับการแสดงออกของ PmAgo2 และ PmAgo3 ด้วยวิธี multiplex-PCR ในปฏิกิริยาที่มีส่วนประกอบเหมือนกับปฏิกิริยาในการเพิ่มจำนวนของ PmAgo1 แต่ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ PmAgo2 (0.2  $\mu$ M ของไพรเมอร์ N-PmAGO2F1 และ 0.2  $\mu$ M N-PmAGO2R1) และ PmAgo3 (และ 0.2  $\mu$ M ของไพรเมอร์ PmAGO3F และ 0.2  $\mu$ M PmAGO3R) และทำปฏิกิริยาของ PmAgo2 ที่ 94 °C เวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วยปฏิกิริยาหลุ่ที่ 94 °C 30 วินาที 55 °C 15 วินาที 72 °C 30 วินาที จำนวน 28 รอบ และ 72 °C เวลา 7 นาที 1 รอบ ส่วนระดับการแสดงออกของ PmAgo3 ใช้ปฏิกิริยาที่ 94 °C เป็นเวลา 3 นาที 1 รอบ ตามด้วยปฏิกิริยาหลุ่ที่ 94 °C 30 วินาที 60 °C 30 วินาที 72 °C 30 วินาที จำนวน 27 รอบ และ 72 °C เวลา 7 นาที 1 รอบ

#### 4. การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของโปรตีน Argonaute ด้วยโปรแกรม SCION IMAGE และการวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ระดับการแสดงออกของอาร์โกนาทแต่ละชนิด จากกึ่งแต่ละกลุ่มด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับระดับของแอกตินด้วยโปรแกรม SCION IMAGE เพื่อวัดความเข้มแถบดีเอ็นเอและวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ One-Way ANOVA และการวิเคราะห์ t-test analysis เพื่อบอกความแตกต่างในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง

#### ผลการทดลอง

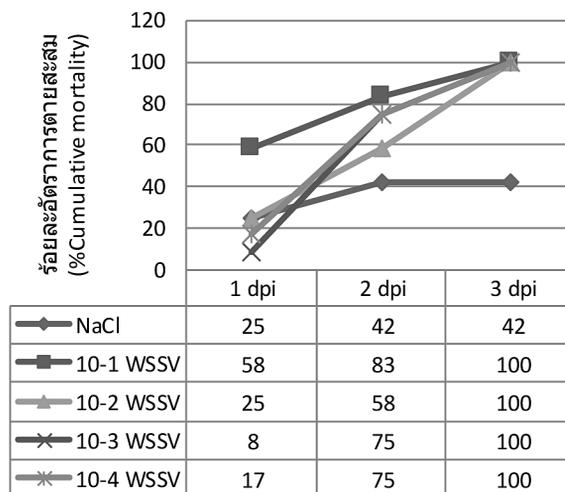
##### 1. การตรวจสอบปริมาณไวรัสที่มีผลให้กึ่งกุลาดำตายเฉียบพลันในวันที่ 3 หลังการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

จากการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ความเจือจาง  $1 \times 10^{-1}$  ถึง  $1 \times 10^{-4}$  ให้กับกึ่งกุลาดำและติดตามอัตราการตายของกึ่งในแต่ละกลุ่ม เพื่อหาปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เหมาะสมที่ทำให้กึ่งตายในวันที่ 3 หลังการฉีดเชื้อ พบว่ากึ่งที่ได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาวที่  $1 \times 10^{-1}$  มีอัตราการตายในวันที่ 1 หลังการฉีดเชื้อ (dpi) สูงที่สุด คือ ร้อยละ 58 ขณะที่กึ่งที่ได้รับไวรัสในปริมาณอื่น ๆ มีอัตราการตายในวันที่ 1 ระหว่างร้อยละ 8 - 25 โดยกึ่งที่ได้รับไวรัสทุกกลุ่มมีอัตราการตายสะสมร้อยละ 100 ในวันที่ 3 หลังการฉีดเชื้อ ขณะที่กึ่งในกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย 150 mM NaCl มีอัตราการตายสะสมในวันที่ 3 อยู่ที่ร้อยละ 42 ดังแสดงในรูปที่ 1 จากผลการทดลองนี้จึงเลือกปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ความเจือจาง  $1 \times 10^{-3}$  เนื่องจากมีอัตราการตายในวันที่ 1 น้อยที่สุดคือ ร้อยละ 8 และอัตราการตายร้อยละ 100 ในวันที่ 3 หลังการฉีดเชื้อ เพื่อให้ในการทดลองเพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนอาร์โกนาท หลังการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งกุลาดำที่ได้รับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน CpG ODNs ต่อไป

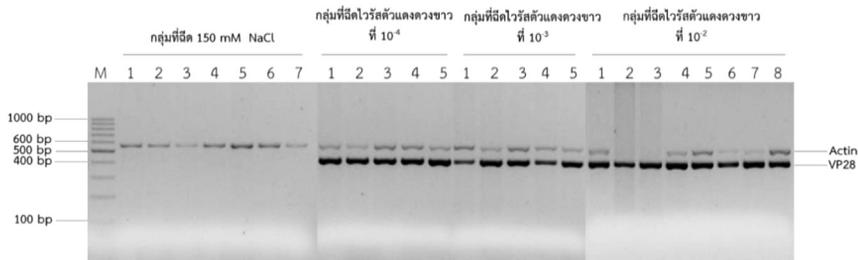
นอกจากนี้เมื่อเก็บเนื้อเยื่อเหงือกของกึ่งทุกกลุ่มที่ตายในวันที่ 3 หลังการฉีดเชื้อ มาตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยเพิ่มปริมาณ transcript ของยีน VP28 ของไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยวิธี RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ VP28-3 และ VP28-4 พบว่าสามารถตรวจพบแถบของ VP28 ขนาด 447 bp ในกึ่งทุกตัวที่ฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ขณะที่ไม่พบแถบของไวรัสตัวแดงดวงขาวในกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย 150 mM NaCl (รูปที่ 2) ซึ่งเป็นการยืนยันว่ากึ่งกุลาดำที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นกึ่งที่ปลอดจากไวรัสตัวแดงดวงขาว และกึ่งที่ได้รับการฉีดเชื้อไวรัสจะตายจากการติดเชื้อ ทั้งนี้กึ่งในกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย NaCl ที่มีอัตราการตายสะสมร้อยละ 42 ตั้งแต่วันที่ 1 หลังการฉีดเชื้อ อาจจะตายด้วยสาเหตุอื่นเช่น ความเครียดหรือบาดเจ็บจากการโดนฉีด แต่ไม่ได้เป็นผลจากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

## 2. การแสดงออกของยีน Argonaute ของกิ้งกูดำ หลังการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและได้รับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน CpG ODNs

เพื่อตรวจสอบการตอบสนองของยีน Argonaute ต่อการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน CpG ODNs ได้ทำการฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาวให้กับกิ้งที่ได้รับอาหารปกติและได้รับอาหารผสมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน CpG ODNs พบว่ากิ้งกลุ่มที่ฉีดด้วยไวรัสตัวแดงดวงขาวตายทั้งหมดในวันที่เก็บผลการทดลอง (3 วันหลังการฉีดไวรัส) และสามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน VP28 ของไวรัสตัวแดงดวงขาวในกิ้งที่ตายหลังฉีดไวรัสทุกตัว ขณะที่ไม่พบการแสดงออกของ VP28 ในกิ้งกลุ่มควบคุม (รูปที่ 3) ซึ่งยืนยันว่ากิ้งในกลุ่มที่ฉีดด้วยไวรัสตัวแดงดวงขาวตายจากการติดเชื้อไวรัส



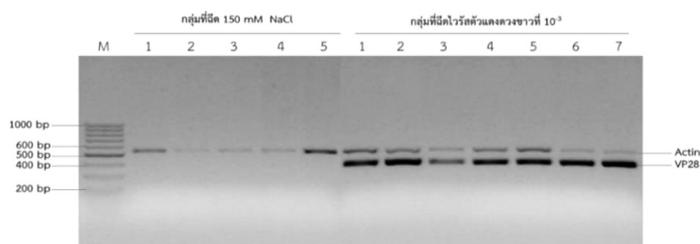
รูปที่ 1 แผนภูมิร้อยละอัตราการตายสะสมของกิ้งกูดำหลังได้รับการฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ปริมาณต่างๆ ได้แก่  $1 \times 10^{-1}$   $1 \times 10^{-2}$   $1 \times 10^{-3}$   $1 \times 10^{-4}$  และ 150 mM NaCl ที่เวลา 1 - 3 วันหลังการฉีดไวรัส (dpi)



**รูปที่ 2** การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งที่ตายในวันที่ 3 หลังการฉีดด้วยไวรัสตัวแดงดวงขาว ที่ความเจือจาง  $1 \times 10^{-2}$   $1 \times 10^{-3}$  และ  $1 \times 10^{-4}$  เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย 150 mM NaCl (M แทนเครื่องหมายดีเอ็นเอ 100 bp ปริมาณ 100 ng 1-8 แทนกึ่งกุลาดำแต่ละตัวในกลุ่มการทดลอง)

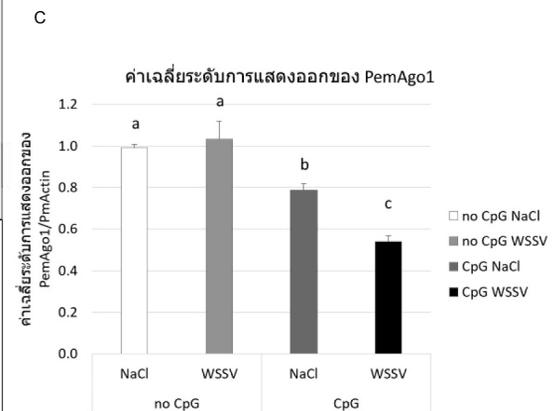
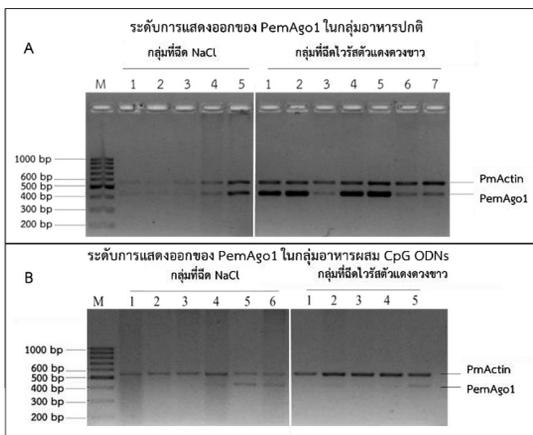
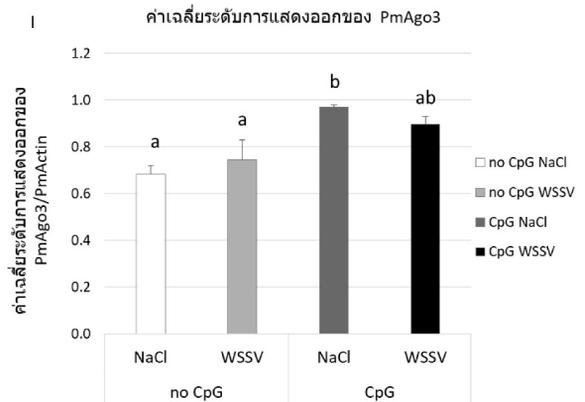
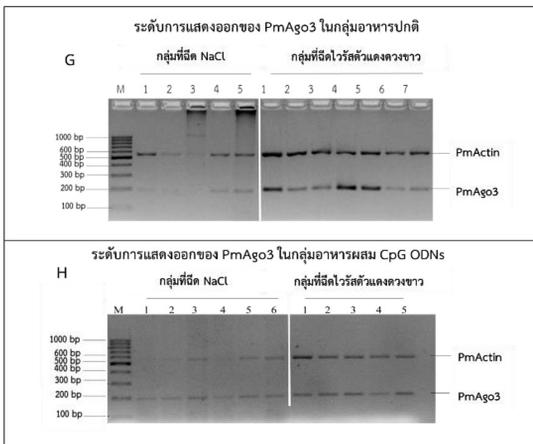
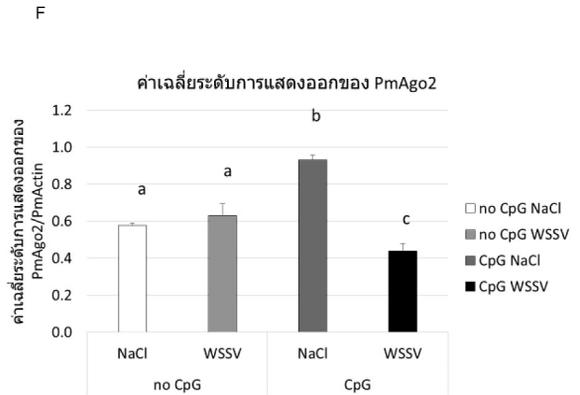
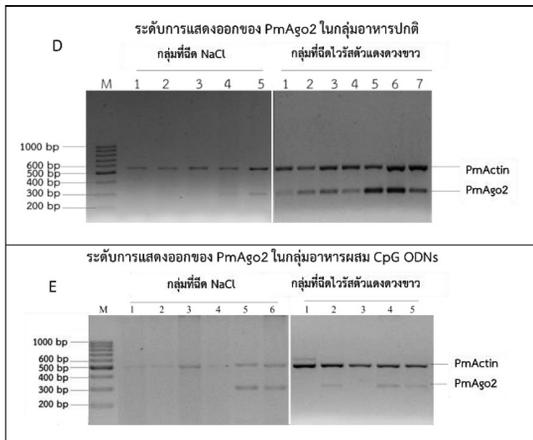
## 2. การแสดงออกของโปรตีน Argonaute ของกึ่งกุลาดำ หลังการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและได้รับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน CpG ODNs

เพื่อตรวจสอบการตอบสนองของโปรตีน Argonaute ต่อการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน CpG ODNs ได้ทำการฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาวให้กับกึ่งที่ได้รับอาหารปกติและได้รับอาหารผสมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน CpG ODNs พบว่ากึ่งกลุ่มที่ฉีดด้วยไวรัสตัวแดงดวงขาวตายทั้งหมดในวันที่เก็บผลการทดลอง (3 วันหลังการฉีดไวรัส) และสามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน VP28 ของไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งที่ตายหลังฉีดไวรัสทุกตัว ขณะที่ไม่พบการแสดงออกของ VP28 ในกึ่งกลุ่มควบคุม (รูปที่ 3) ซึ่งยืนยันว่ากึ่งในกลุ่มที่ฉีดด้วยไวรัสตัวแดงดวงขาวตายจากการติดเชื้อไวรัส



**รูปที่ 3** การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของการทดลองที่ 2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนอาร์โกนาท (Argonaute) หลังจากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเมื่อฉีดกึ่งด้วย 150mM NaCl และ ไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ความเข้มข้น  $10^{-3}$  (M แทนเครื่องหมายดีเอ็นเอ 100 bp ปริมาณ 100 ng 1-7 แทนกึ่งกุลาดำแต่ละตัวในกลุ่มการทดลองนั้น ๆ)

เมื่อวัดระดับการแสดงออกของยีน PmAgo ชนิดที่ 1 2 และ 3 ในเหงือกของกุ้งกุลาดำ ที่ให้อาหารเม็ดปกติและกลุ่มที่ให้อาหารเม็ดผสมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน CpG ODNs โดยเปรียบเทียบระหว่างกุ้งกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย 150 mM NaCl กับกลุ่มที่ฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ความเจือจาง  $1 \times 10^{-3}$  พบว่าระดับการแสดงออกของ PmAgo ทั้ง 3 ชนิดในกุ้งกลุ่มที่ได้รับอาหารเม็ดปกติไม่มีการเปลี่ยนแปลงภายหลังการติดไวรัสตัวแดงดวงขาว เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย NaCl (รูปที่ 4) โดยกุ้งที่ให้อาหารเม็ดผสมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน CpG ODNs มีการแสดงออกของ PmAgo1 น้อยกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ทั้งกุ้งในกลุ่มควบคุมและกุ้งที่ได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาว (รูปที่ 4A-4C) นอกจากนี้การแสดงออกของยีน PmAgo1 ในกุ้งที่ติดไวรัสแล้วให้อาหารเม็ดผสม CpG ODNs มีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4A-4C) เมื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของ PmAgo2 ในกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารทั้งสองแบบ พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสม CpG ODNs มีการแสดงออกของ PmAgo2 สูงกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อฉีดกุ้งด้วยไวรัสตัวแดงดวงขาวในกลุ่มที่ได้รับอาหารผสม CpG ODNs จะทำให้มีการแสดงออกของ PmAgo2 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับทั้งกุ้งในกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารผสม CpG ODNs และกุ้งที่ได้รับอาหารปกติที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาว (รูปที่ 4D-4F) ขณะที่การแสดงออกของ PmAgo3 ในกลุ่มควบคุมจะมีระดับสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อกุ้งได้รับอาหารผสม CpG ODNs เปรียบเทียบกับกุ้งที่ได้รับอาหารปกติ ส่วนกุ้งกลุ่มที่ฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาวและได้รับอาหารผสม CpG ODNs ไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนเมื่อเทียบกับกุ้งกลุ่มอื่น ๆ (รูปที่ 4G-4I)



**รูปที่ 4** การตรวจสอบระดับการแสดงออกของ Argonaute ชนิดต่าง ๆ ในกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารเม็ดปกติ และกุ้งที่ได้รับอาหารผสมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน CpG ODNs ซึ่งในแต่ละกลุ่มจะเปรียบเทียบทั้งกุ้งที่ฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาวและกุ้งในกลุ่มควบคุมที่ฉีด 150 mM NaCl ระดับการแสดงออกของยีน ภาพที่ 4C 4F และ 4I แสดงกราฟแท่งของ

ค่าเฉลี่ยของระดับการแสดงออกในกึ่งกลุ่มต่าง ๆ ของยีน PmAgo1 PmAgo2 และ PmAgo3 ตามลำดับ ต่อระดับการแสดงออกของ PmActin โดยคำนวณจากความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วย RT-PCR ในภาพ 4A-B 4D-E และ 4G-H ตามลำดับ และคำนวณโดยโปรแกรม SCION IMAGE ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่วิเคราะห์ด้วย one way ANOVA และ t-test analysis error bar คือ SEM

### สรุปและวิจารณ์ผล

กระบวนการอาร์เอ็นเออินเตอร์เฟอเรนซ์ หรืออาร์เอ็นเอไอ (RNAi) เป็นหนึ่งในระบบภูมิคุ้มกันสำหรับต้านทานไวรัสในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ เช่น พืช สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Ding and Voinnet, 2007; Leggewie and Schnettler, 2018) การศึกษาในกึ่งที่ผ่านมาพบว่า โปรตีนในกระบวนการ RNAi เช่น Argonaute มีการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัส ซึ่งสนับสนุนว่ากึ่งใช้กระบวนการ RNAi ในการสร้างความต้านทานต่อไวรัสเช่นเดียวกับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ในการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจจะศึกษาว่า Argonaute ทั้งสามชนิดของกึ่งกุลาดำมีการแสดงออกที่ตอบสนองต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เวลา 72 ชั่วโมงหลังการฉีดไวรัสหรือไม่ โดยกึ่งได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ความเจือจาง  $1 \times 10^{-3}$  เนื่องจากการทดสอบปริมาณไวรัสพบว่าไวรัสตั้งแต่  $1 \times 10^{-1}$  ถึง  $1 \times 10^{-3}$  ทำให้กึ่งตายหมดในวันที่ 3 แต่ปริมาณที่  $1 \times 10^{-3}$  ของไวรัสเป็นปริมาณที่ทำให้กึ่งตายในวันที่ 1 ค่อย ๆ ทอยตาย โดยมีอัตราการตายในวันที่ 1 ต่ำที่สุด หลังการฉีดไวรัสพบว่า PmAgo1 2 และ 3 มีระดับการแสดงออกที่ไม่แตกต่างจากกึ่งที่ไม่ได้รับไวรัส อย่างไรก็ตาม การศึกษาก่อนหน้านี้ โดย Unajak et al. (2006) พบว่าระดับการแสดงออกของ PmAgo1 mRNA สูงขึ้น 2-3 เท่าในช่วงแรกหลังได้รับไวรัสและลดลงอย่างรวดเร็วที่ 30 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ นอกจากนี้ PmAgo2 ก็ตอบสนองต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวในลักษณะเดียวกัน คือ มีการตอบสนองสูงสุดที่ 24 ชั่วโมงหลังจากกึ่งได้รับไวรัส และเริ่มมีระดับการแสดงออกที่ลดลงที่เวลา 48 ชั่วโมง (Yang et al., 2014) จึงเป็นไปได้ว่ากลไก RNAi เป็นกลไกที่ตอบสนองในระยะ 24-48 ชั่วโมงแรกของการติดเชื้อไวรัส แต่เนื่องจากในการศึกษานี้ทำการตรวจวัดระดับการแสดงออกของ Argonaute ในกึ่งกำลังจะตาย (moribund) ที่ 72 ชั่วโมงจึงไม่พบการแสดงออกที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

จากการรายงานของ Sun et al. (2014) และ Zhang et al. (2010) รายงานว่าสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน CpG ODNs สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและกระตุ้นโมเลกุลต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการต้านไวรัสรวมถึง Argonaute ด้วย จึงได้ศึกษาการตอบสนองของ PmAgo1 2 และ 3 ต่อ CpG ODNs ทั้งในสภาวะปกติและสภาวะที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว พบว่า Argonaute ทั้งสามชนิดของกึ่งกุลาดำมีการตอบสนองต่อ CpG ODNs ที่แตกต่างกัน ค่าเฉลี่ยระดับการแสดงออกของ PmAgo1 ในกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน CpG ODNs มีระดับลดลงอย่างมี

นัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ทั้งกึ่งที่ฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาวและ NaCl เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่ไม่ได้ผสม CpG ODNs อาจกล่าวได้ว่า CpG ODNs อาจจะไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันในวิถีอื่นเพื่อช่วยป้องกันการติดไวรัสตัวแดงดวงขาว จึงทำให้การแสดงออกของ PmAgo1 ลดลง

PmAgo2 มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นในกึ่งกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารผสม CpG ODNs เมื่อเทียบกับกึ่งที่ได้รับอาหารปกติ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Yang et al. (2014) ที่พบว่า PmAgo2 มีการแสดงออกที่ตอบสนองต่อ Poly(I:C) แสดงว่า CpG ODNs สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน RNAi ที่อาศัย PmAgo2 ได้ในกึ่งกุลาดำ นอกจากนี้ Yang et al. (2014) ยังรายงานว่า PmAgo2 มีการแสดงออกสูงขึ้นเมื่อกึ่งมีการติดเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และไวรัสตัวแดงดวงขาว อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้พบว่าเมื่อกึ่งที่ได้รับอาหารผสม CpG ODNs มีการติดไวรัสตัวแดงดวงขาว จะส่งผลให้การแสดงออกของ PmAgo2 ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกึ่งที่ไม่ได้รับไวรัส อาจกล่าวได้ว่า PmAgo2 น่าจะตอบสนองต่อการติดไวรัสตัวแดงดวงขาว แต่การกระตุ้นภูมิคุ้มกันในวิถีอื่นในสภาวะที่กึ่งได้รับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน CpG ODNs อาจจะช่วยสร้างภูมิคุ้มกันในช่วง 72 ชั่วโมงหลังการฉีดไวรัส ส่งผลให้ระดับการแสดงออกของ PmAgo2 ลดลงเช่นเดียวกับ PmAgo1

การศึกษาการแสดงออกของ PmAgo3 ของ Phetrungnapa et al. (2013) พบว่า PmAgo3 มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มปริมาณไวรัสหัวเหลืองในกึ่งกุลาดำ เนื่องจากยีนของไวรัสมีการแสดงออกลดลงเมื่อมีการยับยั้งการแสดงออกของ PmAgo3 ด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่ นอกจากนี้ Ho et al. (2019) พบว่าการยับยั้งการแสดงออกของ PmAgo3 ในกึ่งกุลาดำส่งผลให้เกิดการยับยั้งการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวและยังทำให้กึ่งที่ติดไวรัสทั้งสองชนิดตายช้าลง ในการศึกษาครั้งนี้การแสดงออกของ PmAgo3 ในกึ่งที่ได้รับอาหารผสม CpG ODNs มีระดับสูงกว่ากึ่งที่ได้รับอาหารปกติ แสดงว่ากลไก RNAi ที่อาศัย PmAgo3 เป็นหนึ่งในระบบภูมิคุ้มกันในกึ่งที่ถูกกระตุ้นด้วย CpG ODNs เช่นเดียวกับ PmAgo2 อย่างไรก็ตามการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งที่ได้รับอาหารผสม CpG ODNs ไม่มีผลต่อระดับการแสดงออกของ PmAgo3 เมื่อเทียบกับกึ่งที่ได้รับอาหารผสม CpG ODNs ที่ไม่ได้ติดไวรัส แสดงให้เห็นว่า PmAgo3 ในกึ่งกุลาดำไม่มีบทบาทสำคัญเมื่อกึ่งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในสภาวะที่ได้รับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน CpG

การศึกษาที่ผ่านมาของ Zhang et al. (2010) เกี่ยวกับกลไกการทำงานของ CpG ODNs ในระบบภูมิคุ้มกัน พบว่า CpG ODNs กระตุ้นปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต้านไวรัส เช่น Dicer Argonaute STAT และ ROS ในกึ่งขาวแวนนาไม โดยกึ่งขาวแวนนาไมที่ได้รับการฉีดรีคอมบีแนนท์พลาสมิดที่สร้าง CpG ODNs ตามด้วยการฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาว มีระดับการแสดงออกของ Argonaute ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ฉีด PBS ตามด้วยการฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาว ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษานี้เพราะเมื่อกึ่งกุลาดำได้รับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน CpG ODNs และติดไวรัสตัวแดงดวงขาวพบว่าการแสดงออกของ PmAgo1

และ PmAgo2 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มกุ้งที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ไม่ได้รับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน CpG ODNs

ถึงแม้ว่าการศึกษานี้จะพบการแสดงออกของ PmAgo ชนิดต่าง ๆ ที่ตอบสนองต่อการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวในสภาวะที่ได้รับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน CpG ODNs ที่เวลา 72 ชั่วโมง หลังการติดไวรัส แต่อาจเป็นช่วงเวลาที่นานเกินไปเนื่องจากการตอบสนองของ PmAgo ต่อไวรัส จะเห็นได้ชัดเจนในช่วง 24-48 ชั่วโมงหลังจากได้รับไวรัส ดังนั้นเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครอบคลุมมากยิ่งขึ้น เกี่ยวกับการตอบสนองของ Argonaute ทั้งสามชนิดของกุ้งกุลาดำต่อการติดไวรัสตัวแดงดวงขาว และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน CpG ODNs จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในช่วงแรกก่อน 72 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ โดยเฉพาะช่วง 6-48 ชั่วโมง ซึ่งนอกจากจะเป็นช่วงที่เห็นการตอบสนองของ Argonaute ต่อการติดไวรัสที่ชัดเจน ยังพบการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงของยีนที่มีความสำคัญในกระบวนการต่าง ๆ เช่น ยีนในระบบภูมิคุ้มกัน ระบบควบคุม โสมีโอสเตซิสของน้ำในร่างกาย กระบวนการอะปอโทซิส ยีนของโปรตีนที่จับกับกรดนิวคลีอิก ยีนในกระบวนการเมตาบอลิซึม การถ่ายโอนสัญญาณ การตอบสนองต่อความเครียด และ การลอกคราบ (Shekhar et al, 2015) อีกด้วย นอกจากนี้ ยังอาจใช้เป็นแนวทางในการให้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน CpG ODNs กับกุ้งตั้งแต่ยังเล็กเพื่อช่วยให้ กุ้งมีภูมิคุ้มกันต้านทานต่อไวรัสซึ่งจะช่วยให้กุ้งตายช้าลงหรืออาจจะอยู่รอดมากขึ้นเมื่อได้รับเชื้อไวรัส ตัวแดงดวงขาว

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนวิจัยจากกองทุนวิจัย จากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร คุณชัยณรงค์ ชาญพิพัฒน์กุล บ.ไทยวาแลบบอราทอริส์ จำกัด ที่เอื้อเฟื้อห้องปฏิบัติการและสถานที่สำหรับการทดลองเลี้ยงกุ้งที่ฟาร์มมานพ อ.เมือง จ.ตราด สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือและอุปกรณ์ที่จำเป็นและสำคัญอย่างยิ่งต่อการวิจัยในครั้งนี้

## เอกสารอ้างอิง

- Dechklar, M., Udomkit, A. & Panyim, S. (2008). Characterization of Argonaute cDNA from *Penaeus monodon* and implication of its role in RNA interference. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 367, 768–774.
- Ding, S.W., & Voinnet, O. (2007) Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*. 130, 413-426.
- Lightner, D.V. (1996). A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for disease of cultured penaeid shrimp. *World Aquaculture Society*.

- Li, F. & Xiang, J. (2013). Recent advances in researches on the innate immunity of shrimp in China. **Developmental and Comparative Immunology**. 39(1–2).
- Ho, T., Panyim, S. & Udomkit, A. (2019). Suppression of argonautes compromises viral infection in *Penaeus monodon*. **Developmental and Comparative Immunology**. 90, 130–7.
- Labreuche, Y., Veloso, A., De, E., Gross, P.S., Chapman, R.W., & Browdy, C.L. (2010). Non-specific activation of antiviral immunity and induction of RNA interference may engage the same pathway in the Pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Developmental and Comparative Immunology**. 34, 1209–18.
- Leebonoi, W., Sukthaworn, S., Panyim, S. & Udomkit, A. (2015). A novel gonad-specific Argonaute 4 serves as a defense against transposons in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Fish and Shellfish Immunology**. 42(2), 280–8.
- Leggewie, M. & Schnettler, E. (2018) RNAi-mediated antiviral immunity in insects and their possible application. **Current Opinion in Virology**. 32, 108-114.
- Shekhar, M.S., Gomathi, A., Gopikrishna, G. & Ponniah, A.G. (2015). Gene expression profiling in gill tissues of White spot syndrome virus infected black tiger shrimp *Penaeus monodon* by DNA microarray. **Virus disease**. 26(1-2), 9–18.
- Milutinovi, B. & Kurtz, J. (2016). Immune memory in invertebrates. Vol. 28, Seminars in Immunology.
- Phetrungnapha, A., Ho, T., Udomkit, A., Panyim, S., & Ongvarrasopone, C. (2013). Molecular cloning and functional characterization of Argonaute-3 gene from *Penaeus monodon*. **Fish and Shellfish Immunology**. 35(3), 874–82.
- Sukthaworn, S., Panyim, S. & Udomkit, A. (2019). Functional characterization of a cDNA encoding Piwi protein in *Penaeus monodon* and its potential roles in controlling transposon expression and spermatogenesis. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 229, 60-68
- Sun, R., Wang, M., Wang, L., Yue, F., Yi, Q. & Huang, M. (2014). The immune responses triggered by CpG ODNs in shrimp *Litopenaeus vannamei* are associated with LvTolls. **Developmental & Comparative Immunology**. 43(1), 15–22.
- Unajak, S., Boonsaeng, V. & Jitrapakdee, S. Isolation and characterization of cDNA encoding Argonaute, a component of RNA silencing in shrimp (*Penaeus monodon*). **Comparative Biochemistry and Physiology**. 2006;145(2):179–87.

Yang, L., Li, X., Jiang, S., Qiu, L., Zhou, F. & Liu, W. (2014). Characterization of Argonaute 2 gene from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and its responses to immune challenges. **Fish and Shellfish Immunology**.36(1), 261–9.

Zhang, Y., Song, L., Zhao, J., Wang, L., Kong, P. & Liu, L. (2010). Protective immunity induced by CpG ODNs against white spot syndrome virus (WSSV) via intermediation of virus replication indirectly in *Litopenaeus vannamei*. **Developmental & Comparative Immunology**. 34(4), 418–24.

.....