

การแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันของกุ้งขาวแวนนาไม
ที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยวิธี differential displayed RT-PCR

THE DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION OF *LITOPENAEUS VANNAMEI*
AFTER WHITE SPOT SYNDROME VIRUS INFECTION
BY DIFFERENTIAL DISPLAYED RT-PCR

วันทนา ลีบอน้อย^{1*}, ปณิดา กลิ่นสีสุข¹, ธมนต์พช บุญลา¹, พรธิชา อินทรชิต¹ และ อภินันท์ อุดมกิจ²

¹สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร กรุงเทพมหานคร 10220

²สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล พุทธมณฑล นครปฐม 73170

Wantana Leebonoi^{1*}, Panida Klinsesuk¹, Thamobphat Boonla¹, Pornticha Intarachot¹
and Apinunt Udomkit²

¹Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Phranakorn Rajabhat University, Bangkok, 10220

²Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Salaya Campus, Nakhon Pathom, 73170

*E-mail: vasabi_am@hotmail.com

Received: 2019-08-29

Revised: 2019-11-28

Accepted: 2019-11-28

บทคัดย่อ

กุ้งขาวแวนนาไมเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย แต่ในปัจจุบันประสบปัญหาโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว ทำให้ผลผลิตกุ้งมีจำนวนลดน้อยลงซึ่งส่งผลกระทบต่อเกษตรกรอย่างมาก การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหา ยีนที่แสดงออกต่างกันเมื่อกุ้งขาวแวนนาไมติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ด้วยการฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาวปริมาณที่ทำให้กุ้งขาวแวนนาไมตายเฉียบพลันในวันที่ 3 หลังการฉีดและใช้เพื่อค้นหา ยีนที่แสดงออกต่างกันในตอนของการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว หลังการติดเชื้อที่เวลาต่าง ๆ ได้แก่ 0 6 9 12 24 และ 48 ชั่วโมง โดยวิธี differential displayed RT-PCR ใช้การจับคู่ของไพรเมอร์ จำนวน 45 คู่ไพรเมอร์ ของไพรเมอร์ oligo-dT₉ ที่มีปลายห้อยสองเบสจำนวนสามชนิด ได้แก่ AT หรือ GT หรือ CG กับไพรเมอร์ส้อมจับ 15 ไพรเมอร์ (P1 ถึง P15) พบแถบดีเอ็นเอที่มีระดับการแสดงออกสูงขึ้นมากกว่าสองเท่า จำนวนทั้งหมด 30 แถบ จากการจับคู่ของไพรเมอร์ 9 คู่ ได้แก่ คู่ไพรเมอร์ oligo-dT-AT กับไพรเมอร์แบบส้อมจับ P4 จำนวน 1 แถบ

คู่ไพรเมอร์ oligo-dT-CG กับ ไพรเมอร์แบบสุ่มจับ P1 หรือ P2 หรือ P3 หรือ P4 จำนวน 17 แถบ ในขณะที่ คู่ไพรเมอร์ oligo-dT-GT กับ ไพรเมอร์แบบสุ่ม P3 หรือ P4 หรือ P9 หรือ P10 จำนวน 12 แถบ แถบดีเอ็นเอเหล่านี้จะนำไปวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอและหาข้อมูลจาก GenBank ในงานวิจัยต่อไป

คำสำคัญ: กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus) ปฏิบัติการพอลิเมอเรสของการแสดงออกต่างกัน (differential displayed RT-PCR)

ABSTRACT

White leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) is an important economically aquatic animal of Thailand. White spot syndrome virus infection caused lost shrimp product and made an economic loss. This study aimed to investigate the differential gene expression response to white spot syndrome virus infection in white leg shrimp. The quantity of white spot syndrome virus causes acute lethality at the 3rd day post-injection was an investigation in white leg shrimp. This dose was used to search for differential gene expression that response to white spot syndrome virus infection at the several timelines after white spot syndrome virus injection at 0, 6, 9, 12, 24 and 48 hour post-injection by differential displayed RT-PCR method by forty-five combinations between a two-bases anchored oligo-dT primer including AT, GT or CG and an arbitrary primer (P1 to P15). The total 30 DNA bands which two times up-regulation from each pair of corresponding bands were obtained from 9 combination primers. The PCR product from the combination between two-base anchored oligo-dT primer with arbitrary primer obtained 1 band from oligo-dT-AT and P4, 17 bands from oligo-dT-CG and P1, P2, P3, or P4 whereas 12 bands from oligo-dT-GT and P3, P4, P9 or P10. These selected-bands would be then read for DNA sequence and search in the GenBank database in the next study.

Keywords: *Litopenaeus vannamei* white spot syndrome virus differential displayed RT-PCR

บทนำ

กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) เป็นกุ้งที่ถูกนำเข้ามาเลี้ยงอย่างแพร่หลายในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545 ซึ่งเป็นช่วงที่กุ้งกุลาดำประสบปัญหาโรคกุ้งจากการติดเชื้อไวรัสอย่างหนักและทำให้ราคาผลผลิตลดลงอย่างมากเมื่อเทียบกับกุ้งขาวแวนนาไม เกษตรกรจึงหันมา

เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเพิ่มมากขึ้นแต่การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในพื้นที่เดียวกันกับกุ้งกุลาดำที่มีปัญหาโรคไวรัสกุ้งจึงเป็นสาเหตุให้กุ้งขาวแวนนาไมติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โรคไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นหนึ่งในโรคไวรัสที่ทำความเสียหายมากเป็นอันดับหนึ่งในบรรดาโรคทุกชนิดต่ออุตสาหกรรมเลี้ยงกุ้งของไทยซึ่งพบได้ทั้งในกุ้งทะเลทุกชนิดรวมทั้งกุ้งขาวแวนนาไมด้วย (*L. vannamei*) โรคไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เกิดจาก white spot syndrome virus (WSSV) มีชื่อเรียกหลายชื่อได้แก่ โรคไวรัสตัวแดงดวงขาว โรคไวรัสจุดขาว โรคไวรัสดวงขาว ซึ่งจะแสดงอาการมีจุดขาวด้านใต้เปลือกบริเวณส่วนหัวและด้านข้างลำตัว ส่วนหาง กุ้งที่ติดไวรัสนี้จะกินอาหารลดลงไม่ลอกคราบและตายในที่สุดซึ่งอัตราการตายสูงถึง 80-100% ภายใน 4-5 วัน (ชลอ ลิมสุวรรณ, 2546) การตรวจสอบไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยโปรตีน VP28 ซึ่งเป็นโปรตีนห่อหุ้มหลัก ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในกระบวนการ host-virus interaction ของไวรัสชนิดนี้ (Bas et al., 2016) และมีบทบาทสำคัญในขั้นตอนแรกของการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้ง (Sánchez-Paz., 2010) ซึ่งจากปัญหาโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งขาวแวนนาไมนี้จึงมีการศึกษาค้นคว้าเพื่อหาทางแก้ไขปัญหาดังกล่าว

ระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งเป็นแบบ innate immune response ระบบตอบสนองแบบไม่มีความจำเพาะและไม่มีความจำ หรือไม่มีแอนติบอดีที่สามารถจดจำสิ่งแปลกปลอมแล้วสร้างภูมิต้านทานมาทำจัดในครั้งต่อไป ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งนี้ประกอบด้วยเซลล์เม็ดเลือด hemocyte (การห่อหุ้มและการจับกิน) สารน้ำ ได้แก่ เปปไทด์ต่อต้านแบคทีเรีย เอนไซม์ไลโซไซม์ ลิโปไลแซคคาไรด์ โปรตีน β -1,3-glucan และโมเลกุลจดจำ ระบบการทำงานร่วมกัน (ขบวนการแข็งตัวของโปรตีน ระบบโพพินอลออกซิเดส) (Aguirre-Guzmán et al., 2009) นอกจากนี้ในปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับการมีปฏิสัมพันธ์กันระหว่างกุ้งและเชื้อไวรัส ได้แก่ วิธีการส่งสัญญาณของระบบภูมิคุ้มกัน (immune signaling pathway) ได้แก่ Toll/IMD-NF κ B และ JAK-STAT กระบวนการยับยั้งการแสดงออกของยีน (RNAi) ฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) และ อะปอโทซิส (apoptosis) (Wang et al., 2014) แต่การศึกษากลไกระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งที่ต่อต้านไวรัสยังไม่เป็นที่แน่ชัด ดังนั้นจึงต้องการค้นหายีนที่เกี่ยวข้องเมื่อถูกไวรัสจุลชีพเข้ามาในเซลล์

วิธี differential displayed RT-PCR หรือ ddRT-PCR เป็นเทคนิคเพื่อศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันในระดับ mRNA ระหว่างแต่ละเนื้อเยื่อของเซลล์ยูคาริโอต โดยใช้เทคนิคนี้ในการเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของยีนระหว่างสองตัวอย่างขึ้นไป โดยหลักการจะเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA โดยกระบวนการ reverse transcription ใช้ชุดไพรเมอร์ที่มีปลายห้อยสองเบสด้าน 3' เพื่อสร้างห้องสมุด cDNA ของแต่ละตัวอย่าง ตามด้วยการเพิ่มปริมาณด้วย PCR โดยใช้ไพรเมอร์มีปลายห้อยด้าน 3' ร่วมกับไพรเมอร์แบบสุ่มจับ (Peale and Gerritsen, 2001) การศึกษาที่ผ่านมาของ Tawe (1998) ได้ค้นหายีนที่ตอบสนองต่อความเครียดต่อพาราคอทใน *Caenorhabditis elegans* โดยใช้ ddRT-PCR พบยีนที่แสดงออกสูงขึ้น 40 เท่าใน mRNA ในประชากรหนอน ยีน L-1/M-47 ถอดรหัสได้ยีน เอนไซม์ detoxification glutathione

S-transferase ยีน M-132 ถอดรหัสได้ A potential stress-responsive transcription factor with C₂H₂-type zinc finger motifs and an N-terminal leucine zipper domain ยีน M-96 ถอดรหัสได้ โปรตีนตัวใหม่ที่ตอบสนองต่อความเครียด นอกจากนี้พาราคอวทังเป็นที่ยทราบกันอีกว่าจะสร้างอนุมูลอิสระ superoxide และพบว่า superoxide dismutase (SOD) แสดงออกสูงขึ้นสองเท่าในประชากรหนอนเพื่อตอบสนองต่อพาราคอวท (Tawe et al., 1998) นอกจากนี้มีการศึกษาการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันในเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ *Vibrio harveyi* โดยใช้คู่ไพรมเมอร์ปลายห้อยด้าน 3' และไพรมเมอร์แบบสุ่มจับ 44 คู่ มีแถบดีเอ็นเอที่แสดงออกต่างกันจำนวน 79 แถบ ซึ่งได้มาจากคู่ไพรมเมอร์ -33 คู่ ประกอบด้วย มีการแสดงออกสูงขึ้น 48 แถบ (61%) และแสดงออกต่ำลง 31 แถบ (39%) หลังการติดเชื้อ *V. harveyi* หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แสดงออกต่างกัน 48 ชิ้นมาเพิ่มปริมาณอีกครั้ง ด้วย PCR และโคลน จำนวน 257 โคลน ถูกเลือกอย่างสุ่มแล้วนำมาหาลำดับดีเอ็นเอ ลำดับดีเอ็นเอ 85 จาก 267 โคลน แมชกับลำดับดีเอ็นเอในฐานข้อมูล GenBank ซึ่ง 24 ลำดับของยีนที่แตกต่างกันเป็นยีนที่ยทราบหน้าที่ ได้แก่ glucose transporter 1 interferon-related developmental regulator 1 lysozyme profilin SERPINB3 ได้ถูกเลือกเพื่อยืนยันรูปแบบการแสดงออกต่างกันโดย realtime PCR พบว่ายีนที่มีการแสดงออกต่างกันสูงของยีนบนเม็ดเลือดกุ้งหลังการติดเชื้อแบคทีเรีย สรุปยีนที่เกี่ยวข้องได้แก่ The anti-lipopolysaccharide factor type 3 (ALFPm3) (Hirono et al., 2006)

การศึกษครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการหา ยีนที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งขาวแวนนาไม

วิธีการ

1. ตัวอย่างกุ้งขาวแวนนาไม

นำกุ้งขาวแวนนาไมปลอดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งของเกษตรกรใน อ.เมือง จ.ตราด และมาพักไว้ที่บ่อพักกุ้งที่มีการให้ออกซิเจนตลอดเวลาประมาณ 1-2 วัน ก่อนทำการทดลองเพื่อลดความเครียดให้กับกุ้ง

2. การหาปริมาณของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ทำให้กุ้งขาวแวนนาไมตายเฉียบพลันในวันที่ 3 หลังการฉีดเชื้อ

กุ้งที่ปลอดเชื้อถูกแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 5-8 ตัว ได้แก่ กลุ่มที่ฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ทำให้เจือจาง 1×10^{-1} 1×10^{-2} 1×10^{-3} 1×10^{-4} เท่า และกลุ่มควบคุมที่ฉีด 150 mM NaCl ตามลำดับ โดยฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาว (ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.เฉลิมพร องค์วรโสภณ สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล) 50 μ l ด้วยเข็มฉีดยาขนาด 29 G $\times$ 1/2" (0.33 mm $\times$ 12.7 mm) เข้าบริเวณกล้ามเนื้อด้านหลังใต้เปลือกที่ 2 จากส่วนหัวของกุ้งกุลาดำ จากนั้นสังเกตและบันทึกจำนวนกุ้งที่ตายเพื่อหาร้อยละอัตราการตายสะสมและเก็บเนื้อเยื่อเหงือก

ของกึ่งที่ตายเพื่อตรวจสอบไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยวิธี RT-PCR โดยก่อนเก็บเนื้อเยื่อจะทำให้กึ่งสลับด้วยน้ำแข็งก่อน

3. การตรวจสอบไวรัสตัวแดงดวงขาวในเนื้อเยื่อกึ่งด้วยวิธี RT-PCR

นำเนื้อเยื่อเหียงของกึ่งมาสกัดอาร์เอ็นเอด้วย Tri-reagent ตามที่ระบุในคู่มือการใช้งานของ VWR Life Science RiboZol™ จากนั้นใช้อาร์เอ็นเอที่สกัดได้เป็นแม่แบบสำหรับการสังเคราะห์ cDNA สายแรกโดยนำอาร์เอ็นเอต้นแบบปริมาณ 1 µg ผสมกับไพรเมอร์ Oligo-dT₁₅ ในปริมาณ 500 nM ร่วมกับเอนไซม์ 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 มาเพิ่มปริมาณยีน VP28 ของไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เลส (Mullis, K.B et al., 1986) ซึ่งประกอบด้วย 1x Taq DNA polymerase buffer with (NH₄)₂SO₄ 2 mM MgCl₂ 50 nM ของ dNTP แต่ละชนิด 1 Unit Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific) 0.2 µM ของไพรเมอร์ VP28-3 และ 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 PvActin ของกึ่งขาวแวนนาไมเป็นยีนควบคุมที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังนี้ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที 55 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 °C เป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 21 รอบ และรอบสุดท้ายที่ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นตรวจสอบผลผลิตที่ชีอาร์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่ผสมสารเรืองแสง MIDORI GREEN ADVANCE (NIPPON GENETICS EUROPE) 4-6 µl

4. การทดสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอในตัวอย่างอาร์เอ็นเอ

นำอาร์เอ็นเอ 1 ไมโครกรัม ผสมเข้ากับไพรเมอร์ PRT 10 µM จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 5 นาที โดยจะแบ่งไว้ทำ 2 ปฏิกิริยา คือปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์ reverse transcriptase และปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์ reverse transcriptase จากนั้นนำไปปักน้ำแข็ง 5 นาที จากนั้นนำมาแบ่งใส่ทั้งสองปฏิกิริยา คือ ปฏิกิริยาแรก เติมเอนไซม์ Improm-II™ Reverse-Transcriptase (Promega, USA) 1x reaction buffer 3 mM MgCl₂ 0.5 mM dNTP ส่วนปฏิกิริยาที่สอง มีส่วนประกอบทุกอย่างเหมือนปฏิกิริยาแรก ยกเว้นไม่ได้เอนไซม์ Improm-II™ Reverse-Transcriptase (Promega, USA) จากนั้นผสมเข้าด้วยกันแล้วบ่มที่ 25 °C เวลา 5 นาที 42 °C เวลา 60 นาที และ 70 °C เวลา 15 นาที จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณยีนแอคตินเป็นยีนควบคุมที่อุณหภูมิต่าง 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 จากนั้นวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่ผสมสารเรืองแสง MIDORI Green Advance (NIPPON Genetics Europe) 4-6 µl

ตารางที่ 1 ลำดับไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

ชื่อไพรเมอร์	จำนวนเบส (base)	ลำดับเบส (5' → 3')
PvActinF	22	GACTGCTACGTCGGCGACGAGG
PvActinR	23	GCACGGTGGTCATCTCCTGCTCG
VP28-3	20	ATGAGAATGAACTCCACCTTAA
VP28-4	22	CAGAGCCTAGTCTATCAATCAT
oligo-dT-TA	30	CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTA
oligo-dT-CG	30	CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTCG
oligo-dT-GT	30	CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTGT
P1	25	ATTAACCCTCACTAAATGCTGGGGA
P2	26	ATTAACCCTCACTAAATCGGTCATAG
P3	25	ATTAACCCTCACTAAATGCTGGTGG
P4	25	ATTAACCCTCACTAAATGCTGGTAG
P5	26	ATTAACCCTCACTAAAGATCTGACTG
P6	25	ATTAACCCTCACTAAATGCTGGGTG
P7	25	ATTAACCCTCACTAAATGCTGTATG
P8	25	ATTAACCCTCACTAAATGGAGCTGG
P9	25	ATTAACCCTCACTAAATGTGGCAGG
P10	25	ATTAACCCTCACTAAAGCACCGTCC
P11	23	ATACCAGTGGAGCTTGATGTCGC
P12	22	AAACGCCGATCACTTTAGCCGTG
P13	24	ACGACCTAGTCAGAATACTGGCTC
P14	22	ATACGCACTGGATTGACCAACG
P15	22	AAGGTGACCATGTGTCTACCTG

5. การตรวจสอบยีนที่แสดงออกต่างกันในกุ้งขาวแวนนาไมด้วยวิธี ddRT-PCR

การทดลองนี้แบ่งกุ้งขาวแวนนาไม 30 ตัว ออกเป็นสองกลุ่มใหญ่คือ กลุ่มกุ้งที่ฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ความเจือจาง 1×10^{-2} 15 ตัว และกลุ่มกุ้งที่ฉีด 150 mM NaCl 15 ตัว โดยแต่ละกลุ่มใหญ่จะเก็บเนื้อเยื่อเหงือกที่จำนวน 3 ตัว/เวลา จำนวนทั้งหมด 5 เวลา ได้แก่ 6 9 12 24 48 ชั่วโมงหลังการฉีดและกุ้งที่ไม่ได้รับการฉีดสารใด ๆ จะทำการเก็บเนื้อเยื่อเหงือกจากกุ้งจำนวน 3 ตัวเพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุมที่ 0 ชั่วโมง

นำอาร์เอ็นเอมาทำจัดจีโนมิกดีเอ็นเอโดยได้รวมอาร์เอ็นเอจากเหงือกกุ้ง 3 ตัว/เวลา ปริมาณ 1 µg ใส่รวมกับเอนไซม์ RQ1 หรือ DNaseI (Thermo Fisher Scientific) 1 Unit และ 1x RQ1 buffer ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 20 นาที แล้วปั่นบนน้ำแข็ง 2 – 3 นาที เติม stop solution 0.5 µl ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่ 65 °C 10 นาที จากนั้นนำไพรเมอร์ oligo-dT-TA หรือ oligo-dT-CG หรือ oligo-dT-GT ที่ผ่านการบ่มที่ 65 °C 10 นาที เติมเข้าไปในปฏิกิริยาที่เตรียมอาร์เอ็นเอกำจัดจีโนมิกดีเอ็นเอไว้แล้ว ดูดมา 1 µl ใส่ในปฏิกิริยา reverse transcription ที่ประกอบด้วย เอนไซม์ Improm-II™ Reverse-Transcriptase (Promega, USA) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 5 นาที 42 °C เป็นเวลา 60 นาที และ 70 °C เป็นเวลา 10 นาที จะได้ห้องสมุด cDNA ของไพรเมอร์ oligo-dT ทั้งสามไพรเมอร์ จากนั้นนำ cDNA ที่ได้ 50 ng มาเป็นดีเอ็นเอตั้งต้นสำหรับปฏิกิริยา ddRT-PCR โดย ผสมเข้ากับ 1x Taq buffer with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.5 mM MgCl_2 50 nM ของ dNTP แต่ละตัว เอนไซม์ Taq DNA polymerase 1 unit และ 0.4 µM ของไพรเมอร์คู่จับ P1 หรือ P2 ถึง P15 นำไปผสมให้เข้ากัน โดยบ่มที่อุณหภูมิ 94 °C 3 นาที 40 °C 3 นาที 72 °C 3 นาที จำนวน 1 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 °C 30 วินาที 40 °C 30 วินาที 72 °C 2 นาที จำนวน 2 รอบ ที่อุณหภูมิ 72 °C 2 นาที 94 °C 30 วินาที 50 °C 30 วินาที และรอบสุดท้าย ที่อุณหภูมิ 72 °C 7 นาที จำนวน 1 รอบ

6. การคัดเลือกยีนที่แสดงออกต่างกันด้วยวิธี denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

นำตัวอย่างมาผสมเข้ากับ 1x loading dye 5 µl นำไปบ่มที่ 94 °C เป็นเวลา 2 นาที ปั่นบนน้ำแข็งเพื่อคงสภาพดีเอ็นเอก่อนแยกขนาดบน 5% denaturing polyacrylamide gel ที่เตรียมไว้ ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 1100 โวลต์ เป็นเวลา 60-90 นาที หรือสังเกต loading dye อยู่ประมาณสองในสามของเจลจากด้านบน แล้วนำเจลไปย้อมด้วยวิธี silver staining แล้วนำมาคัดเลือกแถบที่แสดงออกต่างกัน โดยสังเกตแถบในตัวอย่างที่เวลาเดียวกันเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่มีการแสดงออกแตกต่างกันมากกว่าสองเท่า และมีขนาดดีเอ็นเอมากกว่า 100 คู่เบส นำเจลอะคริลาไมด์ก่อนและหลังตัดแถบแล้วไปบันทึกภาพด้วยเครื่องสแกนภาพ นับจำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีการแสดงออกต่างกันและบันทึกผล หลังจากนั้นทำการตัดแถบดีเอ็นเอที่คัดเลือกออกจากเจลเพื่อนำมาใช้ในการวิจัยต่อไป

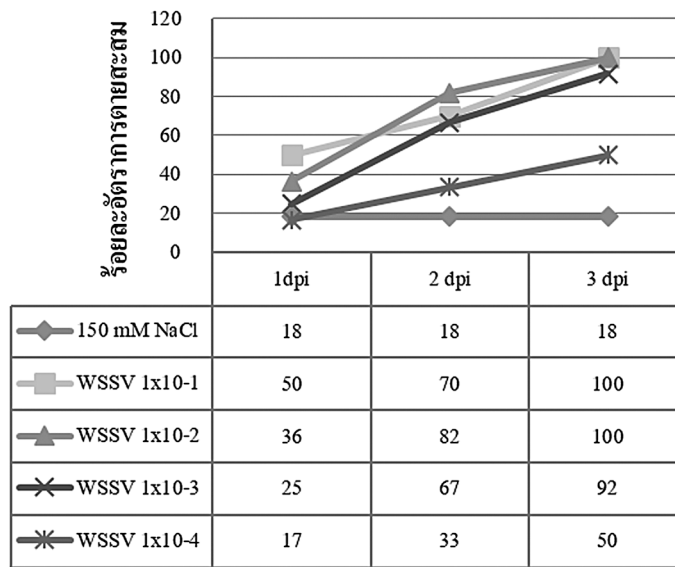
ผลการทดลอง

1. การหาปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ทำให้กุ้งขาวแวนนาไม่ตายเฉียบพลันที่วันที่ 3 หลังการฉีดเชื้อ

จากการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ถูกเตรียมที่ความเจือจาง 1×10^{-1} ถึง 1×10^{-4} ให้กับกุ้งขาวแวนนาไม่และติดตามอัตราการตายของกุ้งในแต่ละกลุ่ม เพื่อหาปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เหมาะสมที่ทำให้กุ้งตายในวันที่ 3 หลังการฉีดเชื้อ พบว่ากุ้งที่ได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ 1×10^{-1} มีอัตราการตายในวันที่ 1 หลังจากการฉีดเชื้อ (dpi) สูงที่สุด คือ ร้อยละ 50 ขณะที่กุ้งที่ได้รับไวรัสในปริมาณอื่น ๆ คือ 1×10^{-3} และ 1×10^{-4} มีอัตราการตายในวันที่ 1 ร้อยละ 25 และ 17 ตามลำดับ แต่กุ้งที่ได้รับไวรัสกลุ่มนี้มีอัตราการตายสะสมไม่ถึงร้อยละ 100 ในวันที่ 3 หลังการฉีดเชื้อ ขณะที่กุ้งในกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย 150 mM NaCl มีอัตราการตายสะสมที่ในวันที่ 1 ถึงวันที่ 3 อยู่ที่ร้อยละ 18 ดังแสดงในภาพที่ 1 ในขณะที่ปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ความเจือจาง 1×10^{-2} มีอัตราการตายในวันที่ 1 คือ ร้อยละ 36 น้อยกว่าอัตราการตายกลุ่มที่ฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ 1×10^{-1} คือ ร้อยละ 50 และมีอัตราการตายในวันที่ 3 ถึงร้อยละ 100 ดังรูปที่ 1 จากผลการทดลองนี้จึงเลือกปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ความเจือจาง 10^{-2} เพื่อใช้ในการตรวจสอบยีนที่แสดงออกต่างกันในกลุ่มกุ้งขาวแวนนาไม่ด้วยวิธี ddRT-PCR

2. การตรวจสอบไวรัสตัวแดงดวงขาวในเนื้อเยื่อกุ้งด้วยวิธี RT-PCR

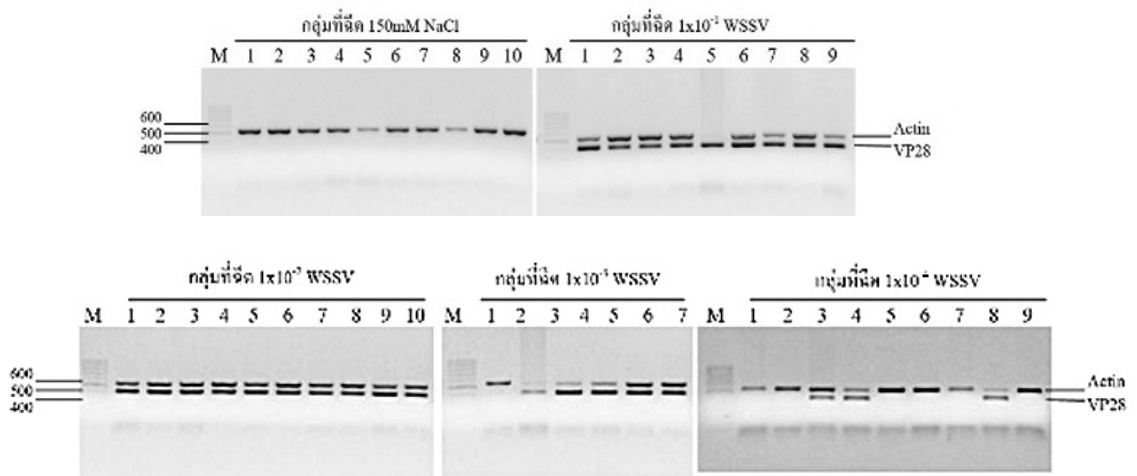
การยืนยันการตายของกุ้งจากการติดเชื้อไวรัส โดยใช้ cDNA ของเนื้อเยื่อเหงือกของกุ้งขาวแวนนาไม่ที่ได้รับการฉีดเชื้อด้วยโคลไรด์และไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ความเจือจาง 1×10^{-1} 1×10^{-2} 1×10^{-3} และ 1×10^{-4} ด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ VP28-3 และ VP28-4 ซึ่งมียีนควบคุมคือ PvActin เมื่อเก็บเนื้อเยื่อเหงือกของกุ้งทุกกลุ่มที่ตายในวันที่ 3 หลังการฉีดเชื้อ มาตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยเพิ่มปริมาณ ทรานสคริปต์ของยีน VP28 ของไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยวิธี RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ VP28-3 และ VP28-4 พบว่าสามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอของยีน VP28 (447 bp) ในกุ้งทุกตัวที่ติดเชื้อ ขณะที่ไม่พบแถบของไวรัสตัวแดงดวงขาวในกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย 150 mM NaCl (รูปที่ 2) ซึ่งยืนยันว่ากุ้งขาวแวนนาไม่ที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นกุ้งที่ปลอดจากไวรัสตัวแดงดวงขาวและกุ้งที่ได้รับการฉีดเชื้อตายจากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวทั้งนี้กุ้งในกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยโคลไรด์ที่มีอัตราการตายสะสมร้อยละ 18 ตั้งแต่วันที่ตายจากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว 1 หลังการฉีดเชื้อ อาจจะตายด้วยสาเหตุอื่นเช่น ความเครียดหรือบาดเจ็บจากการฉีด แต่ไม่ได้ตายจากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว



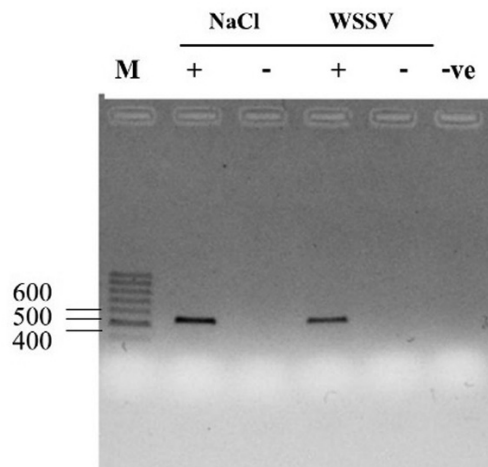
รูปที่ 1 แผนภูมิร้อยละอัตราการตายสะสมของกุ้งขาวแวนนาไม
หลังได้รับการฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ปริมาณต่าง ๆ ได้แก่ 1×10^{-1} 1×10^{-2} 1×10^{-3} 1×10^{-4}
และ 150 mM NaCl ที่เวลา 1 - 3 วันหลังการฉีดไวรัส (dpi)
(dpi คือ day post injection หรือ วันหลังการฉีด)

3. การทดสอบความบริสุทธิ์ของตัวอย่างอาร์เอ็นเอ

เนื่องจากกระบวนการ ddRT-PCR คือตรวจสอบการแสดงออกที่แตกต่างกันของยีน ซึ่งเป็นการสังเกตระดับทรานสคริปต์หรือ mRNA ซึ่งอาร์เอ็นเอที่นำมาใช้จึงต้องเป็นอาร์เอ็นเอที่ไม่มีดีเอ็นเอเจือปนเพื่อให้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา ddRT-PCR เป็นผลที่มาจากทรานสคริปต์ mRNA เท่านั้น จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องยืนยันโดยการทดสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอในตัวอย่างอาร์เอ็นเออีกครั้ง การทดสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอในตัวอย่างอาร์เอ็นเอ การทดลองจะแบ่งออกเป็นสองปฏิกิริยาได้แก่ ปฏิกิริยาที่ใส่ และปฏิกิริยาที่ไม่ใส่เอนไซม์ reverse transcriptase (Improm-II™ Reverse-Transcriptase (Promega, USA)) ซึ่งเอนไซม์ reverse transcriptase จะเป็นเอนไซม์ที่สังเคราะห์ cDNA จาก mRNA เพื่อเป็นแม่แบบที่จะนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนแอกตินโดยไพรเมอร์ PvActinF และ PvActinR ตัวอย่างที่เลือกนำมาทดสอบได้สุ่มเลือกทั้งกุ้งที่ฉีดไซเดียมคลอไรด์และกุ้งที่ฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาว



รูปที่ 2 การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเนื้อเยื่อเหงือก
เพื่อหาปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ทำให้กุ้งตายเฉียบพลันในวันที่ 3 หลังการฉีดเชื้อ
(M แทนเครื่องหมายดีเอ็นเอ 100 bp ปริมาณ 100 ng ตัวเลข 1 ถึง 10 แทนกุ้งขาวแวนนาไม
แต่ละตัวในกลุ่มการทดลอง)



รูปที่ 3 การทดสอบความบริสุทธิ์ของตัวอย่างอาร์เอ็นเอด้วยวิธี RT-PCR

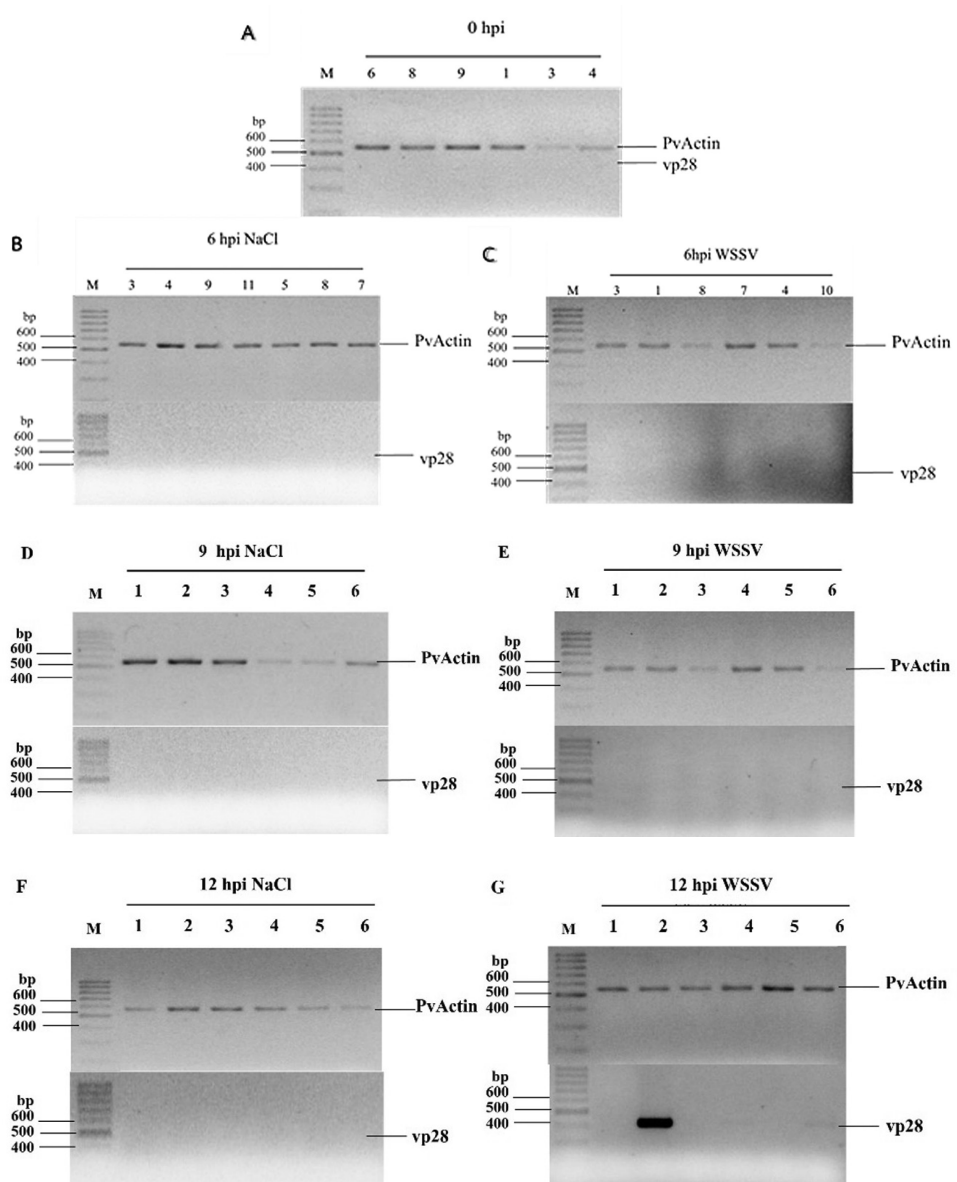
หมายเหตุ : + คือ ปฏิกริยาที่ใส่เอนไซม์ reverse transcriptase
- คือ ปฏิกริยาที่ไม่ใส่เอนไซม์ reverse transcriptase

อาร์เอ็นเอจากกุ่มที่มาจากทั้งกลุ่มที่ฉีดโซเดียมคลอไรด์และไวรัสตัวแดงดวงขาว นำมาทำปฏิกิริยาที่มีและปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์ reverse transcriptase แล้วเพิ่มปริมาณยีน PvActin (NaCl แทนกุ่มที่ฉีดโซเดียมคลอไรด์และ WSSV แทนกุ่มที่ฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาว -ve แทนปฏิกิริยาที่ไม่ได้ใส่ cDNA M แทน ดีเอ็นเอเครื่องหมาย 100 bp)

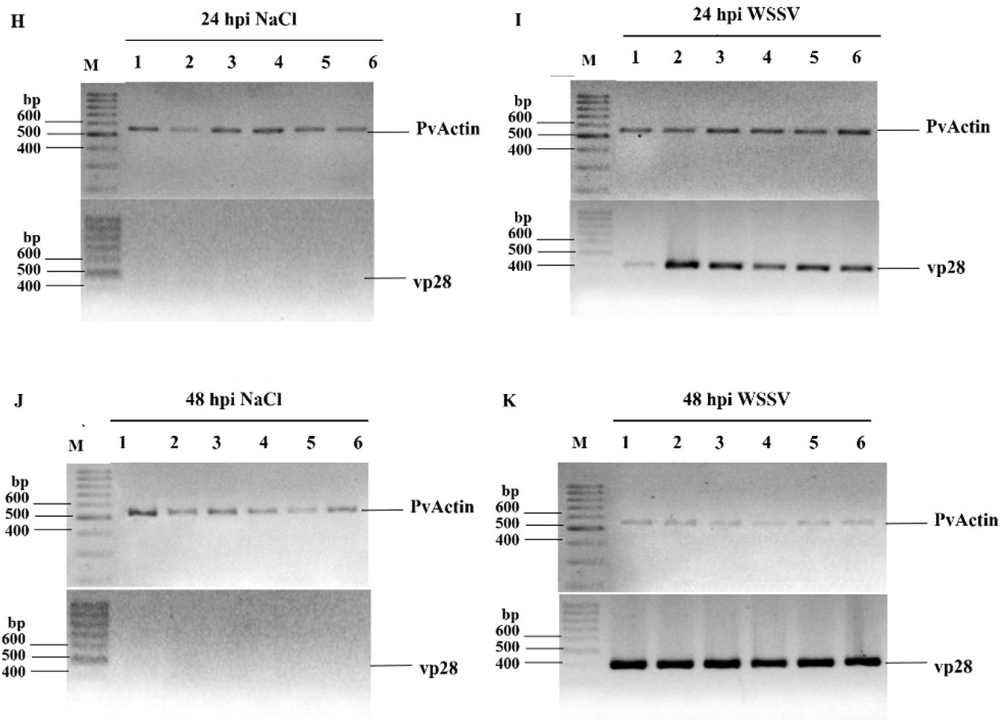
การทดสอบความบริสุทธิ์ของตัวอย่างอาร์เอ็นเอ โดยตัวอย่างอาร์เอ็นเอใช้เป็นแม่แบบ ในการสังเคราะห์ cDNA สายแรก ตรวจสอบโดยการใส่และไม่ใส่เอนไซม์ reverse transcriptase เห็นได้ว่าปฏิกิริยาที่ใส่เอนไซม์ reverse transcriptase จะสามารถเพิ่มยีน PvActin ได้ ในขณะที่ปฏิกิริยาที่ไม่ใส่เอนไซม์ reverse transcriptase จะไม่สามารถเพิ่มยีน PvActin ได้เนื่องจากเอนไซม์ reverse transcriptase เป็นเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยาย้อนกลับสังเคราะห์ cDNA จาก mRNA โดยถ้าปฏิกิริยานั้นที่ไม่ใส่เอนไซม์ reverse transcriptase และไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีนแอดดินได้ แสดงว่าอาร์เอ็นเอที่นำมาใช้บริสุทธิ์จากดีเอ็นเอ

4. การตรวจสอบยีนที่แสดงออกต่างกันในกลุ่มขาวแว่นาไมที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยวิธี ddRT-PCR

ในการตรวจสอบยีนที่แสดงออกต่างกันในกลุ่มขาวแว่นาไมด้วยวิธี ddRT-PCR นั้น กุ่มจะได้รับการฉีดโซเดียมคลอไรด์หรือไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ความเจือจาง 1×10^{-2} แล้วเก็บเนื้อเยื่อเหงือก ที่เวลาต่าง ๆ หลังการฉีดได้แก่ 0 6 9 12 24 48 ชั่วโมงหลังการฉีด (hpi) มาสกัดอาร์เอ็นเอและสังเคราะห์ cDNA สายแรก จาก total RNA หลังจากนั้น ตรวจสอบไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วย PCR โดยใช้ไพรเมอร์ VP28-3 และ VP28-4 ซึ่งมียีนควบคุมคือ PvActin ดังภาพที่ 4



รูปที่ 4 การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกลุ่มที่ฉีดไวรัส ที่ความเจือจาง 1×10^{-2} เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ฉีดไซโตเดียมคลอไรด์ในเนื้อเยื่อเหงือกกุ้งขาว ในการทดลองการตรวจสอบยืนยันที่แสดงออกต่างกันในกลุ่มขาวแวนนาไม่ด้วยวิธี ddRT-PCR (0 hpi แทนกลุ่มของกุ้งที่ไม่ได้รับการฉีดไซโตเดียมคลอไรด์หรือไวรัสตัวแดงดวงขาว ในรูป 4A รูปที่ 4B 4D 4F 4H 4J แทนกลุ่มของกุ้งหลังได้รับการฉีดไซโตเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่ 6 9 12 24 48 hpi คือ ตามลำดับ รูปที่ 4C 4E 4G 4I 4K แทนกลุ่มของกุ้ง หลังได้รับการฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) ที่ 6 9 12 24 48 hpi ตามลำดับ M แทน ดีเอ็นเอเครื่องหมาย 100 bp hpi แทน ชั่วโมงหลังการฉีด)



รูปที่ 4 (ต่อ)

จากการตรวจสอบพบว่ากุ้งที่ได้รับการฉีดเชื้อเดียวมัลลอร์ไต์ไม่มีการแสดงออกของยีนไวรัสตัวแดงดวงขาว (VP28) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากุ้งทุกตัวที่นำมาทดลองปลอดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว และกุ้งที่ได้รับการฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาวพบว่าการแสดงออกของยีนไวรัสตัวแดงดวงขาว (VP28) ในกุ้งบางตัวที่ 12 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ (12 hpi WSSV) ในขณะที่ 24 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ (24 hpi WSSV) พบการแสดงออกของยีน VP28 ในกุ้งทุกตัว และที่ 48 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อไวรัส (48 hpi WSSV) พบการแสดงออกของยีน VP28 ในกุ้งทุกตัวและมีการแสดงออกในระดับค่อนข้างสูง

การตรวจสอบยีนที่แสดงออกแตกต่างกันในกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับการฉีดเชื้อเดียวมัลลอร์ไต์หรือไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ความเจือจาง 1×10^{-2} ด้วยวิธี Differential-display reverse transcription PCR (ddRT-PCR) ในวิธี ddRT-PCR และโดยใช้ไพรเมอร์ปลายห้อยสองเบสจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ olido-dT-TA หรือ olido-dT-CG หรือ olido-dT-GT เข้าคู่กับไพรเมอร์สุ่มจับ (ไพรเมอร์ P1 หรือ P2 ถึง P15) ลำดับดีเอ็นเอของไพรเมอร์แสดงในตารางที่ 1 การเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนระหว่าง 2 กลุ่มการทดลองคือระหว่างกลุ่มที่ฉีดเชื้อเดียวมัลลอร์ไต์และกลุ่มที่ฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาว จากนั้นใช้ polyacrylamide gel electrophoresis ในการแยกขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้และทำการย้อมเจลด้วยวิธี silver staining โดยเก็บเนื้อเยื่อเหียงจาก 0 6 9 12 24 และ 48 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อนำมาเปรียบเทียบกันทั้งสองกลุ่มโดยมีกลุ่ม 0 ชั่วโมง คือกลุ่มที่กุ้งไม่ได้รับการฉีดเชื้อเดียวมัลลอร์ไต์

หรือไวรัสเป็นกลุ่มควบคุม จะเห็นได้ว่าเมื่อนำทั้งสองกลุ่มมาเปรียบเทียบระดับการแสดงออกกันแล้วพบว่า มีดีเอ็นเอบางแถบมีระดับการแสดงออกที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แถบดีเอ็นเอที่มีระดับการแสดงออกที่แตกต่างกันในเจลอะครีลาไมด์

ไพรเมอร์ oligo-dT ที่มีปลายห้อย 2 เบส	ไพรเมอร์สุ่มจับ	กลุ่มทดลอง / ชั่วโมงหลังการฉีดเชื้อ (hpi*)	ขนาดประมาณ (คู่เบส)
oligo-dT-TA	P4	NaCl / 48	200
	P10	NaCl / 48	900
	P3	WSSV / 9	150
		WSSV / 24	250
oligo-dT-CG	P4	NaCl / 6	220(1)**
		NaCl / 6	220(2)**
		WSSV / 6	600(1)**
		WSSV / 6	600(2)**
		NaCl / 12	200
		NaCl / 12	700(1)**
		NaCl / 12	700(2)**
		WSSV / 12	600(1)**
		WSSV/12	600(2)**
		oligo_dT_GT	P3
NaCl 12	>300		
P4	NaCl 12		700
	NaCl 12		>200(1)**
	NaCl 12		>200(2)**
	WSSV 12		>100
	P9		NaCl 12
oligo_dT_GT	P10	NaCl 12 (2)	200
		WSSV 12 (3)	190
		NaCl 24 (4)	120
		WSSV 24 (5)	140(1)**
		WSSV 24 (6)	140(2)**

หมายเหตุ : hpi คือ hours post injection หรือ ชั่วโมงหลังการฉีดเชื้อ

แถบดีเอ็นเอที่มีสองแถบอยู่ติดกันจากกลุ่มการทดลองเดียวกันและเวลาหลังการฉีดเชื้อเดียวกัน

แถบดีเอ็นเอที่มีระดับการแสดงออกที่แตกต่างกันในเจลอะคริลาไมด์ในกึ่งขาวแวนนาไม ของคู่ไพรเมอร์ oligo-dT-TA กับ ไพรเมอร์สุ่มจับ P4 และ กับ P10 พบจำนวน 1 แถบจากทั้งสองคู่ไพรเมอร์ ในขณะที่คู่ไพรเมอร์ oligo-dT-CG กับไพรเมอร์สุ่มจับ P3 (oligo-dT-CG/P3) พบจำนวน 2 แถบ และกับ P4 (oligo-dT-CG/P4) พบ 9 แถบ และคู่ไพรเมอร์ oligo_dT_GT กับไพรเมอร์สุ่มจับ P3 (oligo_dT_GT/P3) พบ จำนวน 1 แถบ กับ P4 (oligo_dT_GT/P4) พบจำนวน 5 แถบ กับ P9 (oligo_dT_GT /P9) พบจำนวน 1 แถบ และกับ P10 (oligo_dT_GT/P10) 5 แถบ ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ซึ่งจะเห็นความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอที่แสดงออกต่างกันซึ่งเกิดจากการสุ่มจับของคู่ไพรเมอร์ต่าง ๆ เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งเมื่อนำดีเอ็นเอจากแถบ เหล่านี้ไปอ่านลำดับดีเอ็นเอ และจับคู่กับลำดับดีเอ็นเอในฐานข้อมูล GenBank (NCBI) เพื่อค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งขาวแวนนาไมในการวิจัยครั้งต่อไป

สรุปและวิจารณ์ผล

ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งเป็นภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดไม่มีแอนติบอดีที่สามารถจดจำสิ่งแปลกปลอมแล้วสร้างภูมิคุ้มกันมากำจัดในครั้งต่อไป เมื่อกุ้งได้รับเชื้อโรคเช่นไวรัสตัวแดงดวงขาว จึงไม่สามารถสร้างภูมิคุ้มกันได้ และกุ้งมีปฏิสัมพันธ์กับเชื้อโรคผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น Toll/IMD-NFkB และ JAK-STAT กระบวนการยับยั้งการแสดงออกของยีน (RNAi) ฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) และอะปอโทซิส (apoptosis) (Wang et al., 2014) โดยได้มีการค้นหาระดับการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันมากมายในการงานวิจัยที่ผ่านมา มีการศึกษาการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันในเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ *Vibrio harveyi* โดยวิธี ddRT-PCR สรุปยีนที่เกี่ยวข้องได้แก่ The anti-lipopolysaccharide factor type 3 (ALFPm3) (Hirono et al., 2006) แต่เนื่องจากกลไกเหล่านี้ยังไม่เป็นที่แน่ชัดจึงจำเป็นต้องค้นหายีนที่เกี่ยวข้องเมื่อถูกไวรัสจุลชีพเข้ามาในเซลล์ วิธีการ ddRT-PCR เป็นวิธีที่ถูกเลือกเพื่อหายีนที่มีการแสดงออกสูงขึ้นหรือต่ำลงเมื่อไวรัสจุลชีพเข้าไปในเซลล์กุ้งในงานวิจัยครั้งนี้

โดยในการศึกษานี้ต้องการค้นหายีนที่มีระดับการแสดงออกที่แตกต่างกันเมื่อกุ้งขาวแวนนาไมได้รับการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ความเจือจางต่าง ๆ ที่ทำให้กุ้งตายเฉียบพลันที่วันที่ 3 หรือ ภายใน 72 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ พบว่าเมื่อฉีดกุ้งที่ความเจือจางของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ 1×10^{-2} กุ้งมีอัตราการตายวันที่ 1 ร้อยละ 36 เมื่อเทียบกับความเจือจาง 1×10^{-3} คือร้อยละ 25 แต่อัตราการตายวันที่ 3 คือร้อยละ 100 ในขณะที่ความเจือจาง 1×10^{-3} อัตราการตายเพียงร้อยละ 92 จากผลการทดลองนี้จึงเลือกปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ความเจือจาง 1×10^{-2} เพื่อใช้ในการตรวจสอบยีนที่แสดงออกต่างกันในกลุ่มขาวแวนนาไมด้วยวิธี ddRT-PCR เนื่องจากเป็นความเจือจางของไวรัสที่ทำให้กุ้งตายที่วันที่ 3 ซึ่งใกล้เคียงกับการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวแบบรุนแรงที่ทำให้กุ้งตายภายใน 3-5 วัน (ชลอ ลิ้มสุวรรณ, 2546)

การตรวจสอบการตายจากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งขาวแวนนาไม ที่ความเจือจาง 1×10^{-1} ถึง 1×10^{-4} และกลุ่มที่ฉีด 150mM NaCl โดยวิธี RT-PCR เมื่อตรวจสอบ โดยใช้ไพรเมอร์ VP28-3 และ VP28-4 ซึ่งมียืนควบคุม คือ PvActin พบว่าสามารถตรวจพบแถบ ของยีนไวรัสตัวแดงดวงขาว VP28 (447 bp) ในกุ้งทุกตัวที่ฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาวทั้งความเจือจาง 1×10^{-1} ถึง 1×10^{-2} และพบได้บางตัวที่ความเจือจาง 1×10^{-3} และ 1×10^{-4} เนื่องจากปริมาณไวรัส อาจจะมีความน้อยที่จะสามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธี RT-PCR หลัง 72 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ ในขณะที่ไม่พบแถบของไวรัสตัวแดงดวงขาวในกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย 150 mM NaCl แสดงว่ากุ้ง ที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ปลอดจากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและเหมาะสมที่จะนำมาใช้เพื่อ การทดลองทำให้กุ้งติดเชื้อหลังจากการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในปริมาณที่ทำให้กุ้งตายที่ วันที่ 3 คือความเจือจางไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ 1×10^{-2}

การทดลองการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันในกุ้งขาวแวนนาไม ที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วย ddRT-PCR จำเป็นต้องตรวจสอบการตายของกุ้งขาวแวนนาไม จากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ความเจือจาง 1×10^{-2} และกลุ่มที่ฉีด 150mM NaCl โดยวิธี RT-PCR หลังการฉีดกุ้งที่เวลา 0 6 9 12 24 และ 48 ชั่วโมงหลังการฉีด พบว่ากุ้งที่ได้รับการฉีด เชื้อเดียวมคอไรด์ไม่มีการแสดงออกของยีนไวรัสตัวแดงดวงขาว (VP28) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากุ้งทุกตัว ที่นำมาทดลองปลอดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวอย่างแน่นอนและกุ้งที่ได้รับการฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาว พบว่ามีการแสดงออกของยีนไวรัสตัวแดงดวงขาว (VP28) ในกุ้งบางตัวที่ 12 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ (12 hpi WSSV) เนื่องจากเป็นช่วงแรกที่ไวรัสจุลิมเซลล์และเนื้อเยื่อกุ้งและยังตรวจสอบด้วย RT-PCR ก่อนข้างยาก แต่ในขณะที่ 24 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ (24 hpi WSSV) พบการแสดงออกของยีน VP28 ในกุ้งทุกตัว และที่ 48 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อไวรัส (48 hpi WSSV) พบการแสดงออกของยีน VP28 ในกุ้งทุกตัวและมีการแสดงออกในระดับค่อนข้างสูงเนื่องมาจากไวรัสตัวแดงดวงขาวมีการ เพิ่มจำนวน (virus replication) และแพร่กระจายไปหลายเนื้อเยื่อทั่วตัวกุ้ง จึงสามารถตรวจสอบ และเพิ่มปริมาณด้วย RT-PCR ได้และมีแถบดีเอ็นเอเข้ม แสดงถึงการเพิ่มจำนวนไวรัสตัวแดงดวงขาว ในปริมาณค่อนข้างสูง เนื่องจากเป็นไวรัสที่ฉีดกุ้งมีปริมาณสูงมากที่ทำให้กุ้งตายเฉียบพลันที่ วันที่ 3

การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันในกุ้งขาวแวนนาไมที่ติดเชื้อไวรัส ตัวแดงดวงขาวด้วย ddRT-PCR คือตรวจสอบการแสดงออกที่แตกต่างกันของยีนซึ่งเป็นการสังเกตร ะดับทรานสคริปต์หรือ mRNA ซึ่งอาร์เอ็นเอที่นำมาวิเคราะห์ต้องทดสอบความบริสุทธิ์ของ อาร์เอ็นเอโดยไม่ใส่เอนไซม์ reverse transcriptase แล้วสังเกตความสามารถในการเพิ่มปริมาณ ยีน PvActin จากผลการทดลองปฏิกิริยา ที่ใส่เอนไซม์ reverse transcriptase จะสามารถเพิ่ม ยีน PvActin ได้ แสดงว่าในปฏิกิริยาที่สามารถเพิ่มยีน PvActin ได้นั้นมีการเปลี่ยน cDNA ซึ่งเป็น สารตั้งต้นสำหรับการเพิ่มปริมาณยีน PvActin

ในขณะที่ปฏิกิริยาที่ไม่ใส่เอนไซม์ reverse transcriptase จะไม่สามารถเพิ่มยีน PvActin ได้เนื่องจากไม่มีสารตั้งต้นสำหรับการเพิ่มยีนหรือไม่มีดีเอ็นเอเจอบนนั่นเอง ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า อาร์เอ็นเอตั้งต้นที่นำมาใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันในกุ้งขาวแวนนาไม ที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วย ddRT-PCR ซึ่งเป็นอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างเดียวกันนี้ปราศจาก ดีเอ็นเอเจอบนซึ่งจะไม่มีเพิ่มปริมาณด้วย PCR จากดีเอ็นเอแน่นอน

นอกจากนี้การศึกษาที่ผ่านมาของ Chungjit et al. (2016) พบว่ารูปแบบการแสดงออกของยีนของกุ้งก้ามกรามเมื่อติดเชื้อไวรัส Nodavirus (MrNV) โดยเทคนิค DD-PCR ใช้ 24 คู่ไพรเมอร์ ระหว่าง Oligo-dT และไพรเมอร์สุ่มจับ พบ 115 แถบจาก 8 คู่ไพรเมอร์ ประกอบด้วยระดับการแสดงออกสูงขึ้น 67 แถบและต่ำลง 48 แถบ หลังจากติดเชื้อ MrNV มี 15 แถบเท่านั้นที่สามารถเพิ่มปริมาณแล้วโคลนได้สำเร็จ พบ 5 ลำดับดีเอ็นเอที่สามารถค้นเจอในฐานข้อมูล GenBank ได้แก่ Crustacyanin-like lipocalin Ferritin 2 และ dLp/HDL-BGBP ซึ่ง Crustacyanin-like lipocalin และ Ferritin 2 เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง (Chungjit et al. 2016) ในการศึกษาครั้งนี้ การตรวจสอบยีนที่แสดงออกต่างกันในกลุ่มขาวแวนนาไมด้วยวิธี ddRT-PCR จำเป็นต้องตรวจสอบการตายจากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในเนื้อเยื่อเหงือกกุ้งขาวแวนนาไมด้วยวิธี RT-PCR โดยเก็บเนื้อเยื่อเหงือกที่เวลาต่าง ๆ หลังการฉีดได้แก่ 0 6 9 12 24 48 ชั่วโมงหลังการฉีด (hpi) แล้วสร้างห้องสมุด cDNA 3 ชุด โดยใช้ไพรเมอร์ oligo-dT ที่มีปลายห้อย 2 นิวคลีโอไทด์ ได้แก่ oligo-dT-TA หรือ oligo-dT-CG หรือ oligo-dT-GT หลังจากนั้น ใช้ไพรเมอร์ oligo-dT เข้าคู่กับไพรเมอร์สุ่มจับ (ไพรเมอร์ P1 หรือ P2 ถึง P15) ทั้งหมด 45 คู่ไพรเมอร์ พบว่า ไพรเมอร์ oligo-dT ที่มีปลายห้อยสองนิวคลีโอไทด์ สามารถเข้าคู่ได้กับไพรเมอร์สุ่มจับเพียงบางตัวเท่านั้น เช่น oligo-dT-TA สามารถเข้าคู่กับ P4 และ P10 oligo-dT-CG สามารถเข้าคู่กับ P3 และ P4 ในขณะที่ oligo-dT-GT สามารถเข้าคู่กับ P3 P4 P9 และ P10 และมีแถบที่แสดงออกต่างกัดังแสดงในตารางที่ 2 จากตารางจะพบแถบดีเอ็นเอที่มีระดับการแสดงออกที่สูงขึ้นมากกว่าสองเท่าจากแต่ละคู่ของแถบที่ตรงกันจำนวน 30 แถบ ซึ่งจะเห็นความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอที่แสดงออกต่างกัน ซึ่งเกิดจากการสุ่มจับของคู่ไพรเมอร์ต่าง ๆ เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งเมื่อนำดีเอ็นเอจากแถบ เหล่านี้ ไปอ่านลำดับดีเอ็นเอและจับคู่กับลำดับดีเอ็นเอในฐานข้อมูล GenBank (NCBI) เพื่อค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมเมื่อมีการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในการวิจัยครั้งต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2561 จากสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ คุณชัยณรงค์ ชาญพิพัฒน์กุล บ.ไทยวาแลบบอราทอรี่ส์ จำกัด ที่เอื้อเฟื้อห้องปฏิบัติการและสถานที่สำหรับการทดลองเลี้ยงกุ้งที่ฟาร์มมานพ อ.เมือง จ.ตราด สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือและอุปกรณ์ที่จำเป็น และสำคัญอย่างยิ่งต่อการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- ชลอ ลิ่มสุวรรณ. (2546). โรคกุ้งขาวแวนนาไม. **สัตว์น้ำเศรษฐกิจกรมประมง**. แหล่งเรียนรู้ด้านประมง. ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. 2545. ศาสตร์ของกุ้งขาว ลิโทพีเนียส แวนนาไม (ตอนที่ 1). **วารสาร สัตว์น้ำ**. 14(154), 87–90.
- Aguirre-Guzman, G., Sanchez-Martinez, J.G., Campa-Cordova, A.I., Luna-Gonzalez, A. & Ascencio, F. (2009). Penaeid Shrimp Immune System. **Thai Journal of Veterinary Medicine**. 39(3), 205–15.
- Arturo, S. (2010). White Spot Syndrome Virus: An Overview on an Emergent Concern. **Veterinary Research**. 41(6).
- Chungjit, A., Wuthisuthimethavee, S., Poompuang, P. & Tunkijjanukij, S. (2016). Gene Expression Profiles in Giant Freshwater Prawn *Macrobrachium Rosenbergii* Infected with *Macrobrachium Rosenbergii* Nodavirus (MrNV) by DD-PCR Technique. **Kasetsart University Fisheries Research Bulletin**. 40(2), 39–50.
- Franklin, V.P. & Gerritsen, M.E. (2001). Gene Profiling Techniques and Their Application in Angiogenesis and Vascular Development. **Journal of Pathology**. 195, 7–19.
- Ikuo, H. & Tassanakajon, A. (2006). Differentially Expressed Genes in Hemocytes of *Vibrio Harveyi* -Challenged Shrimp *Penaeus Monodon*. **Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology**. 39(1), 26–36.
- Mullis, K.B., Erlich, H.A., Arnheim, N., Horn, G.T., Saiki, R.K., & Scharf, S.J. (1986). Process for amplifying, detecting, and/or cloning nucleic acid sequences. United States.
- Tawe, W.N., Eschbach, M.L., Walter, R.D. & Henkle-dührsen, K. (1998). Identification of Stress-Responsive Genes in *Caenorhabditis Elegans* Using RT-PCR Differential Display. **Nucleic Acids Research**. 26(7), 1621–27.

- Verbruggen, B., Bickley, L.K., Aerle, R.V., Bateman, K.S., Stentiford, G.D., Santos, E.M. & Tyler, C.R. (2016). Molecular Mechanisms of White Spot Syndrome Virus Infection and Perspectives on Treatments. **Viruses**. 8(1), 1–29.
- Wang, P.H., Huang, T., Zhang, X. & He, J.G. (2014). Antiviral Defense in Shrimp: From Innate Immunity to Viral Infection. **Antiviral Research**. 108(1).
-