Executive Summary

โครงการวิจัยทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่

Antiviral properties of antimicrobial peptides from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*

สมบัติการต้านไวรัสของโปรตีนต้านจุลชีพจากกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*

---

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

กุ้งเป็นสัตว์เศรษฐกิจของประเทศไทย โดยเมื่อพิจารณาถึงมูลค่าการส่งออกนั้นจะพบว่าประเทศไทยเป็นหนึ่งในสามของผู้ส่งออกกุ้งรายใหญ่ของโลก (Food and Agriculture Organization of the United Nations. Fisheries Dept., 2008) โดยผลผลิตปัจจุบันส่วนใหญ่จะเป็น กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) และกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) เดิมนั้นสัดส่วนของผลผลิตจะเป็นกุ้งกุลาดำมากกว่ากุ้งขาว แต่เนื่องจากปัญหาโรคระบาดในกุ้งกุลาดำทำให้สูญเสียผลผลิตเป็นจำนวนมาก ความนิยมในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำจึงลดลง ทำให้หลังจากปี พ.ศ. 2547 กุ้งขาวได้รับความนิยมในการเลี้ยงมากกว่า (ข้อมูลจาก: FAO Fishstat (2006)) โดยเกษตรกรได้นำเข้ากุ้งขาวปลอดโรค (Specific-Pathogen Free, SPF) มาเลี้ยงทดแทน แต่อย่างไรก็ตามกุ้งขาวที่นำเข้ามานั้นได้ส่งผลกระทบโดยการเป็นพาหะของโรคติดเชื้อทางไวรัส ซึ่งทำให้เกิดโรคระบาด (Briggs *et al.*, 2005; Overstreet *et al.*, 1997) จากปัญหาดังกล่าวสะท้อนให้เห็นว่าการนำเข้ากุ้งขาวปลอดโรค (Specific-Pathogen Free, SPF) เข้ามาเลี้ยงนั้นเป็นการแก้ปัญหาที่ยังไม่ตรงจุด นอกจากปัญหาโรคระบาดที่ทำให้เกิดการสูญเสียผลผลิตของกุ้งแล้ว ยังพบปัญหาอื่น เช่น การที่เกษตรกรใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อรักษาโรคในกุ้ง ทำให้เกิดการตกค้างของยาปฏิชีวนะในผลิตภัณฑ์ของกุ้ง ซึ่งจะถูกต่อต้านจากประเทศผู้นำเข้า วิธีการหนึ่งที่จะมีบทบาทในการช่วยแก้ไขปัญหาดังกล่าว คือ การพัฒนาให้การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำซึ่งเป็นกุ้งท้องถิ่นของไทย แต่ทั้งนี้จะต้องพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงให้ได้กุ้งกุลาดำที่ปลอดโรค รวมถึงพัฒนาสายพันธุ์ของกุ้งกุลาดำที่สามารถต้านทานโรคได้

โรคระบาดที่พบในกุ้งนั้นส่วนใหญ่จะเป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* species ซึ่งจะทำให้กุ้งที่ติดเชื้อนั้นมีการเรืองแสง กินอาหารลดลง ลอกครบช้าลง และอัตราการตายสูง นอกจากเชื้อแบคทีเรียที่จะก่อให้เกิดโรคแล้ว โรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสก็เป็นอีกโรคหนึ่งที่ทำให้เกิดการสูญเสียผลผลิตเป็นจำนวนมาก ไวรัสที่เป็นปัญหานั้นพบได้หลายชนิด ได้แก่ white-spot syndrome virus (WSSV) yellow-head virus (YHV) hepatopancreatic parvovirus (HPV) monodon baculovirus (MBV) taura syndrome virus (TSV) infectious hypodermal and hematopoeitic virus (IHHNV) Mourilyan virus (MOV) และ Laem Singh virus (LSNV) (Flegel, 2006) โดยเฉพาะอย่างยิ่งปัญหาจากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) ซึ่งทำให้อัตราการตายของกุ้งสูงถึง 80-100% ภายใน 3-10 วัน ดังนั้นถ้าสามารถแก้ปัญหาโรคระบาดที่เกิดจากการติดเชื้อได้ก็จะนำไปสู่การเพิ่มผลผลิตของกุ้งในอนาคต

เพื่อที่จะแก้ปัญหาโรคระบาดจากการติดเชื้อนั้น ปัจจุบันได้มีการนำเอาเทคนิคทางอณูชีววิทยา เช่น การใช้เทคนิคทางพีซีอาร์ เข้ามาช่วยในการวินิจฉัยโรคในกุ้ง เพื่อดำเนินการรักษาหรือแก้ไขปัญหาตั้งแต่เริ่มต้น นอกจากเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่ใช้ในการวินิจฉัยโรคในกุ้งแล้ว เทคนิคดังกล่าวยังสามารถนำมาใช้ในการศึกษาถึงระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง ซึ่งจะเป็นการปูพื้นฐานไปสู่ความเข้าใจระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งให้มากขึ้น เพื่อนำไปสู่การพัฒนาในอนาคตได้ สำหรับในการวิจัยนี้จะใช้ทำการศึกษาสมบัติการต้านไวรัสของโปรตีนต้านจุลชีพจากกุ้งกุลาดำ โดยจะศึกษาการตอบสนองของยีนที่สร้างโปรตีนต้านจุลชีพเมื่อกุ้งกุลาดำติดเชื้อไวรัส WSSV YHV TSV โดยใช้เทคนิค semi-quantitative RT-PCR จากนั้นศึกษาความสำคัญของโปรตีนต้านจุลชีพเมื่อกุ้งติดเชื้อไวรัสโดยใช้เทคนิค RNA interference เมื่อทราบว่าโปรตีนต้านจุลชีพนั้นสามารถตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสได้ จึงผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ของยีนต้านจุลชีพดังกล่าวเพื่อนำมาทดสอบสมบัติการต้านไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง (*in vitro*) ผลที่ได้จากงานวิจัยจะช่วยสร้างองค์ความรู้เกี่ยวกับการต้านไวรัสในกุ้ง ซึ่งจะเป็นแนวทางสำคัญในการควบคุมโรค และยังสามารถใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่สามารถต้านทานโรคได้

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

2.1. ศึกษาการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีนต้านจุลชีพเมื่อกุ้งติดเชื้อไวรัส

2.2. ศึกษาสมบัติการต้านไวรัสของโปรตีนต้านจุลชีพในกุ้งและในเซลล์เพาะเลี้ยง

3. ระเบียบวิธีวิจัย

3.1. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีนต้านจุลชีพด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR

ศึกษาการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีนต้านจุลชีพในขณะที่กุ้งติดเชื้อไวรัส ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนที่สร้างโปรตีนต้านจุลชีพในการเพิ่มจำนวนยีนนั้นๆ แล้วเปรียบเทียบปริมาณ PCR product ที่ได้ระหว่างกลุ่มของกุ้งที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ ผลที่ได้จะทำให้ทราบถึงการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีนต้านจุลชีพว่ามีการเปลี่ยนแปลงเป็นอย่างไร เมื่อกุ้งอยู่ในสภาวะติดเชื้อไวรัส

3.1.1. กลุ่มตัวอย่างของสัตว์ทดลอง

กุ้งกุลาดำที่ใช้ในการทดลองจะเป็นกุ้งในช่วงตัวเต็มวัยระยะต้นมีสุขภาพดีและมีน้ำหนักตัวประมาณ 20 กรัม กลุ่มตัวอย่างแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง โดยในกลุ่มทดลองนั้นจะทำการฉีดเชื้อไวรัสที่เจือจางแล้ว ส่วนกลุ่มควบคุมจะถูกฉีดด้วยสารละลายที่ใช้ในการเจือจางเชื้อไวรัส หลังจากฉีดเชื้อที่เวลา 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จะทำการเก็บเลือดของแต่ละกลุ่มเพื่อนำไปสร้าง first-strand cDNA สำหรับทำ RT-PCR ต่อไป

3.1.2. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR

นำเลือดกุ้งที่เก็บได้มาสร้าง first-strand cDNA โดยใช้ ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) และนำ cDNA ที่ได้มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนที่สร้างโปรตีนต้านจุลชีพและยีน β-actin ซึ่งเป็น housekeeping gene จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปวิเคราะห์โดย agarose gel electrophoresis และวัดปริมาณ PCR product จากความเข้มของแถบ DNA ที่บันทึกด้วยกล้อง CCD โดยใช้โปรแกรม Genetools Analysis Software (Syngene) ค่าการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีนต้านจุลชีพจะเทียบเป็น relative expression กับยีน β-actin จากนั้นวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของค่าการแสดงออกของยีนด้วย One Way Analysis of Variance (ANOVA) และ post hoc test (Duncan's new multiple range test)

3.2. การศึกษาบทบาทของโปรตีนต้านจุลชีพด้วยเทคนิค RNA interference

เพื่อที่จะศึกษาความสัมพันธ์ของโปรตีนต้านจุลชีพกับการติดเชื้อไวรัส จึงนำเทคนิค RNA interference เข้ามาใช้ในการศึกษา โดย dsRNA ที่ฉีดเข้าไปในกุ้งนั้นจะเข้าไปขัดขวางไม่ให้มี mRNA ในการสร้างโปรตีน ดังนั้นโปรตีนต้านจุลชีพที่สนใจจึงไม่ถูกผลิต จากนั้นจึงวัดอัตราการตายเมื่อกุ้งดังกล่าวติดเชื้อไวรัส

3.2.1. การสร้าง double strand RNA (dsRNA)

ทำการสร้าง double strand RNA (dsRNA) โดยออกแบบไพรเมอร์ 2 ชุด จากยีนโดยให้มีขนาดประมาณ 300-400 เบส ในชุดแรกสำหรับสร้างเส้น sense ให้ปลายทางด้าน 5' ของไพรเมอร์ Forward มีเบสจำเพาะของ T7 promoter ส่วนชุดที่ 2 เป็นไพรเมอร์สำหรับสร้างเส้น anti-sense ให้ปลายทางด้าน 5' ของไพรเมอร์ Reverse มีเบสจำเพาะของ T7 promoter หลังจากทำการเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยไพรเมอร์ทั้ง 2 ชุดแล้ว ทำการสร้างสาย RNA เส้น

sense และ anti-sense โดยใช้ T7 RNA polymerase ทำการ purify RNA สายเดี่ยวและทำ double strand โดยการผสมเส้น sense และเส้น anti-sense ในอัตราส่วน 1:1 เพื่อให้จับกันเป็นเส้นคู่

3.2.2. การศึกษาผลของการติดเชื้อไวรัสในกุ้งที่ถูกกดการแสดงออก

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองคือกุ้งกุลาดำขนาดประมาณ 1-3 กรัม โดยแบ่งเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว กลุ่มที่ 1 ทำการฉีด dsRNA ของยีนที่สร้างโปรตีนต้านจุลชีพโดยใช้อัตราส่วน 2-5 ไมโครกรัมต่อกุ้งหนัก 1 กรัม กลุ่มที่ 2 ทำการฉีด dsRNA ของยีน GFP ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมการ non-specific ส่วนกลุ่มที่ 3 และ 4 จะถูกฉีดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เพื่อเป็นกลุ่มควบคุม หลังจากการฉีดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กลุ่มที่ 1-3 จะทำการฉีดด้วยไวรัสที่เจือจางแล้ว สำหรับกลุ่มที่ 4 จะเป็นกลุ่มควบคุมโดยถูกฉีดด้วยสารละลายที่ใช้ในการเจือจางไวรัส สังเกตและบันทึกอัตราการตายของกุ้งทุกกลุ่มในแต่ละวัน เพื่อนำมาหาค่าทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดของกุ้งในแต่ละกลุ่ม

3.3. การศึกษาผลของโปรตีนต้านจุลชีพที่มีต่อการติดเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง

เนื่องจากยีนที่สร้างโปรตีนที่มีสมบัติในการต้านจุลชีพในกุ้งกุลาดำมีอยู่หลายชนิด และมีความเป็นไปได้ที่โปรตีนจากยีนเหล่านี้จะมีสมบัติต้านไวรัสในกุ้งได้ อีกทั้งโปรตีนต้านไวรัส ALF*Pm*3 ได้มีการผลิตเป็นโปรตีนรีคอมบิแนนท์และแสดงให้เห็นสมบัติการต้านไวรัส WSSV อาจจะสามารถแสดงสมบัติในการต้านไวรัสชนิดอื่นๆในกุ้ง เช่น YHV และ TSV ดังนั้นเพื่อที่จะศึกษาผลของโปรตีนต้านจุลชีพต่อการติดเชื้อไวรัส และศึกษาโปรตีนรีคอมบิแนนท์ ALF*Pm*3 ต่อการต้านไวรัสชนิดอื่นๆ จึงจำเป็นที่จะต้องทำการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ แล้วนำโปรตีนดังกล่าวมาบ่มกับไวรัส แล้วติดตามความสามารถในการติดเชื้อของไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง เปรียบเทียบกับไวรัสที่ไม่ได้ถูกบ่มกับโปรตีน

3.3.1. การผลิตโปรตีนต้านจุลชีพด้วยเทคนิครีคอมบิแนนท์

ยีนที่สร้างโปรตีนต้านจุลชีพ เช่น crustin lysozyme และ penaeidin รวมถึง ALF*Pm*3 ที่อาจจะมีสมบัติในการต้านไวรัสชนิดอื่น จะถูกผลิตในระบบการแสดงออกของแบคทีเรีย *Escherichia coli* หรือ ยีสต์ *Pichia pastoris* โดยโปรตีนต้านจุลชีพที่ยังไม่เคยมีการผลิตมาก่อน จะเริ่มต้นจากการโคลนชิ้นยีนที่สร้างโปรตีนต้านจุลชีพเข้าสู่ expression vector ที่เหมาะสม จากนั้นนำ transform สู่เซลล์ แล้วจึงคัดเลือกโคโลนีที่มีพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ ด้วยเทคนิค colony PCR นำพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ที่อยู่ในโคโลนีซึ่งผ่านการคัดเลือกแล้วไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ นำพลาสมิดที่มีชิ้นยีนซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องมา transform เข้าสู่เซลล์ *E. coli* หรือ *P. pastoris* แล้วทำการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์โดยอาศัยการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน จากนั้นนำโปรตีนรีคอมบิแนนท์ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE electrophoresis โดยย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie brilliant blue แล้วจึงทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟฟี โปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้จะถูกทดสอบสมบัติการต้านเชื้อจุลชีพ

สำหรับโปรตีนรีคอมบิแนนท์ ALF*Pm*3 ที่ได้มีการผลิตเพื่อทดสอบสมบัติก่อนหน้านี้ และพบว่ามีสมบัติการต้าน WSSV นั้น (Tharntada *et al.*, 2009) จะทำการผลิตเพิ่มเติมเพื่อให้มีปริมาณมากพอที่จะนำไปทดสอบสมบัติการต้านไวรัสชนิดอื่นที่ก่อโรคในกุ้ง โดยจะผลิตในระบบการแสดงออกของยีสต์ *Pichia pastoris* และนำไปทำให้บริสุทธิ์เพื่อทดสอบสมบัติการต้านเชื้อจุลชีพ และไวรัสต่อไป (Somboonwiwat *et al.*, 2005; Tharntada *et al.*, 2009)

3.3.2. การทดสอบการต้านไวรัสของโปรตีนต้านจุลชีพในเซลล์เพาะเลี้ยง

ทำการเก็บ lymphoid จากกุ้งขนาด 20 กรัม แล้วล้างใน washing medium จากนั้นตัดให้ได้ขนาด 1-2 มิลลิเมตร แล้วนำไป incubate ใน working medium เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสมา seed ลงใน 96-well plate โดยมีปริมาณของเซลล์เท่ากับ 1×10^{5} ต่อ 150 ไมโครลิตร แล้วนำไปเลี้ยงที่ 28 °C โดยจะทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกสามวัน เพื่อทดสอบการต้านไวรัสของโปรตีนต้านจุลชีพ จะทำการ incubate ไวรัส และโปรตีนต้าน

จุลชีพกับ cell culture ที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นจะทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ แล้ว incubate ต่อไป เมื่อครบเวลา 36 ชั่วโมง จึงสกัด total RNA โดยใช้ TRI reagent แล้วทำลายดีเอ็นเอที่ปนเปื้อน โดยใช้เอนไซม์ RNase-free DNase I

RNA ที่ได้จะนำมาสร้าง first-strand cDNA โดยใช้ ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) และนำ cDNA ที่ได้มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนของไวรัส และยีนβ-actin วิเคราะห์ PCR product ใน agarose gel electrophoresis วัดปริมาณ PCR product จากความเข้มของแถบ DNA ที่บันทึกด้วยกล้อง CCD โดยใช้โปรแกรม Genetools Analysis Software (Syngene) ค่าการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีนต้านจุลชีพจะเทียบเป็น relative expression กับยีน β-actin จากนั้นวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของค่าการแสดงออกของยีนด้วย One Way Analysis of Variance (ANOVA) และ post hoc test (Duncan's new multiple range test)

4. แผนการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการ

แผนการดำเนินงาน	ผลผลิตที่คาดว่าจะได้รับ			
	ปีที่ 1		ปีที่ 2	
	เดือนที่ 1-6	เดือนที่ 7-12	เดือนที่ 1-6	เดือนที่ 7-12
1. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วย RT-PCR - เก็บเลือดจากกุ้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ที่เวลา 12, 24, 28 และ 72 ชม. - นำเลือดกุ้งมาสร้าง cDNA แล้วใช้เทคนิค semi-quantitative RT-PCR ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน - วิเคราะห์ค่าทางสถิติของผลการทดลองที่ได้	ได้ผลการตอบสนองของยีนที่สร้างโปรตีนต้านจุลชีพ เมื่อกุ้งอยู่ในสภาวะติดเชื้อไวรัส			
2. ศึกษาบทบาทของโปรตีนต้านจุลชีพด้วยเทคนิค RNAi - สร้าง dsRNA ของยีนที่สร้างโปรตีนต้านจุลชีพ - ตรวจสอบผลการกดการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีนต้านจุลชีพ หลังจากกุ้งถูกฉีดด้วย dsRNA - ศึกษาผลของการติดเชื้อไวรัสในกุ้งที่ถูกฉีด dsRNA โดยวัดอัตราการตายของกุ้งในแต่ละกลุ่มการทดลอง - หาค่าทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบอัตราการตายของกุ้งในแต่ละกลุ่ม		ได้ dsRNA ของยีนที่สร้างโปรตีนต้านจุลชีพ ทราบปริมาณของ dsRNA ที่ใช้ในการกดการแสดงออกของยีน	ได้ผลอัตราการตายของกุ้งที่ถูกฉีด dsRNA ของยีนที่สร้างโปรตีนต้านจุลชีพ เปรียบเทียบกุ้งในกลุ่มอื่น	ได้ผลอัตราการตายของกุ้งที่ถูกฉีด dsRNA ของยีนที่สร้างโปรตีนต้านจุลชีพ เปรียบเทียบกุ้งในกลุ่มอื่น ทราบบทบาทของโปรตีนต้านจุลชีพเมื่อกุ้งติดเชื้อไวรัส
3.ศึกษาผลของโปรตีนต้านจุลชีพที่มีผลต่อการติดเชื้อไวรัสในระดับ *in vitro* - ผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ - ทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ - การทดสอบการต้านไวรัส	ได้โปรตีนรีคอม-บิแนนท์ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์แล้ว	ได้โปรตีนรีคอม-บิแนนท์ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์แล้ว ทราบผลของโปรตีนต้านจุลชีพที่มีต่อไวรัส	ทราบผลของโปรตีนต้านจุลชีพที่มีต่อไวรัส	ทราบผลของโปรตีนต้านจุลชีพที่มีต่อไวรัส

5. ผลงานที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

ปีที่ 1: ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์: Antiviral properties of antimicrobial peptide from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*

ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์: Developmental & Comparative Immunology (Impact factor 2008: 2.833)

ปีที่ 2: ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์: *In vitro* antiviral activity of antimicrobial peptide from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*

ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์: Fish and Shellfish Immunology (Impact factor 2008: 3.161)

6. งบประมาณโครงการ

รายการค่าใช้จ่าย	**ปีที่ 1**	**ปีที่ 2**	**รวม 2 ปี**
1. หมวดค่าตอบแทน			
ค่าตอบแทนหัวหน้าโครงการ	120,000	120,000	240,000
2. หมวดค่าวัสดุ/สารเคมี (แสดงรายละเอียดประมาณการในแต่ละรายการ)			
2.1. ตัวอย่างกุ้งและค่าขนส่ง	12,000	27,000	39,000
2.2. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR	20,000	-	20,000
2.3. ศึกษาบทบาทของโปรตีนต้านจุลชีพด้วยเทคนิค RNAi	20,000	40,000	60,000
2.4. ศึกษาผลของโปรตีนต้านจุลชีพที่มีผลต่อการติดเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง			
2.4.1. ผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์และทำให้บริสุทธิ์	35,000	-	35,000
2.4.2. ทดสอบการต้านไวรัสของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ในเซลล์เพาะเลี้ยง	20,000	30,000	50,000
2.5. ค่าวัสดุ			
2.5.1. ค่าวัสดุวิทยาศาสตร์ เช่น สารเคมี เครื่องแก้ว พลาสติก	5,000	10,000	15,000
2.5.2. ค่าวัสดุสำนักงานและวัสดุคอมพิวเตอร์	1,000	2,000	3,000
3. หมวดค่าใช้สอย เช่น ค่าสาธารณูปโภค/ค่าถ่ายเอกสาร/ค่าไปรษณีย์/ค่าธรรมเนียมต่าง ๆ	7,000	11,000	18,000
งบประมาณรวม	**240,000**	**240,000**	**480,000**