## วิธีการดำเนินการวิจัย

ชุดโครงการนี้ประกอบด้วย 4 ชุดโครงการ ที่มีความสัมพันธ์ของชีวโมเลกุลอยู่ในวิถีทางชีวเคมีเดียวกัน กล่าวคือเป็นวิถีที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคไวรัสในกุ้ง

**โครงการที่ 1** "โปรตีนจากกุ้งกุลาดำที่จับกับไวรัสตัวแดงดวงขาว (White Spot Syndrome Virus Binding Protein from *Peneus monodon*)"

- ผลิตส่วนของโปรตีนที่เกาะกับไวรัส WSSV (WSSV binding protein)
- ศึกษาประสิทธิภาพการเกาะของโปรตีนกับไวรัสในการป้องกันโรคกุ้ง
- ศึกษาการเรียงตัวของกรดนิวคลีอิคของ WSSV binding protein เพื่อบ่งชี้ว่าเป็นโปรตีนชนิดใด เพื่อที่จะโคลนยีนเต็มของ WSSV binding protein
- ศึกษาแหล่งของ WSSV binding protein และค้นหา WSSV antigen ที่เกาะกับWSSV binding protein (WBP)

**โครงการที่ 2** "การใช้ rFBP1 จากกุ้งกุลาดำป้องกันไวรัสโรคกุ้ง"

- ผลิตโปรตีนลูกผสม rFBP1
- ทดสอบประสิทธิภาพการใช้โปรตีนลูกผสม rFBP1 ในการป้องกันไวรัสตัวแดงดวงขาวของกุ้งกุลาดำ
- ศึกษาประสิทธิภาพการใช้ผลิตโปรตีนลูกผสม rFBP1 ในการป้องกันไวรัสตัวแดงดวงขาวของกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*)
- ศึกษาประสิทธิภาพการใช้ผลิตโปรตีนลูกผสมในการป้องกันไวรัสหัวเหลือง
- เปรียบเทียบการแสดงออกของ rFBP1 ในกุ้งปกติและกุ้งติดเชื้อ
- ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ rFBP1 และปริมาณไวรัส

**โครงการที่ 3** "การค้นหาโปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์กับ Receptor for Activated Protein Kinase (RACK1) ในกุ้งกุลาดำ"

- เตรียม full length cDNA library จากเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว
- โคลนยีน Pm-RACK1 เข้าสู่ยีสต์เวคเตอร์และใช้ Pm-RACK1 เป็นตัวล่อ (Bait) เพื่อสุ่มหายีนของ RACK1-binding protein(s) จาก cDNA library ของกุ้งกุลาดำในยีสต์
- ศึกษารายละเอียดการเรียงลำดับเบสของ RACK1-binding protein(s)
- สังเคราะห์ยีนของ RACK1-binding protein(s) ให้สมบูรณ์ด้วยเทคนิค RACE

- การตรวจสอบการจับกันของ RACK1 และ RACK1-binding protein(s) แบบ *In vitro*
- ออกแบบ specific primers จากการเรียงลำดับเบสที่สมบูรณ์และใช้ primers ในการทำ Real-time RT-PCR โดยตรวจสอบการแสดงออกของยีนเปรียบเทียบระหว่างสภาวะปกติและสภาวะติดเชื้อ
- ถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงของกุ้ง
- ตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์เพาะเลี้ยง
- ติดตามระยะเวลาการอยู่รอดของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้รับยีน
-

**โครงการที่ 4** "การโคลนและศึกษาสมบัติของยีน 14-3-3 จากกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)"

- ออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 14-3-3 จากกุ้ง
- หาการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน 14-3-3
- ศึกษาการแสดงออกของยีน 14-3-3 ในกุ้งกุลาดำในสภาวะที่ติดเชื้อไวรัสเปรียบเทียบกับสภาวะไม่ติดเชื้อไวรัส
- ศึกษาหน้าที่ของโปรตีน 14-3-3 ในเซลล์เพาะเลี้ยงแมลง