

ผลการวิจัยและบทวิจารณ์

1. การเตรียมดีเอ็นเอเส้นสมบูรณ์ของยีน *Pm-RACK1*

จากการเตรียมดีเอ็นเอเส้นสมบูรณ์ของยีน *Pm-RACK1* โดยการทำให้ 3'RACE พบว่า *Pm-RACK1* มีขนาด 1074 คู่เบส ประกอบด้วยส่วนของ polyadenylation signal (AATAAA) และ poly A ทางด้านปลาย 3' และมีบริเวณ Open reading frame (ORF) 954 คู่เบส แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 318 ตัว ดังแสดงในรูปที่ 7 จากการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของ *Pm-RACK1* กับ สิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ โดยการทำให้ Multiple sequence alignment พบว่า *Pm-RACK1* มีความเหมือนกับ สิ่งมีชีวิตอื่นสูง และประกอบด้วยโดเมน WD ทั้งหมด 7 บริเวณ ดังแสดงในรูปที่ 8 และจากการวิเคราะห์ ความเหมือนของลำดับเบสของ *Pm-RACK1* กับฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Blast พบว่า *Pm-RACK1* เหมือนกับ fruit fly 80% zebra fish 79% mouse และ human 78%

GGCACGAGGGTCGTCCGCACGTGAGATTTATCTCAAGCCATCGCCTGAACAATGA

ATGAATGAGAGCTTACAGCTGCGCGGGACCCTGGTGGGCCACAATGGCTGGGTCACACAG 60
M N E S L Q L R G T L V G H N G W V T Q 20
 ATCGCCACCAACAGGAATTTCCCTGACATGATCCTGTCTGCTTCCAGGGACAAATCTCTG 120
 I A T N R N F P D M I L S A S R D K S L 40
 ATTCTGTGGAAACTGACCCGTGAGGAGAACAACATGGTGTTCCTCCAGAAACGTCTTCAT 180
 I L W K L T R E E N N Y G V P Q K R L H 60
 GGCCACTCCCACCTTCATCACTGATGTTGTTCTTTCTCTGGATGGTCACTTCGCCCTCTCT 240
 G H S H F I T D V V L S L D G H F A L S 80
 GGATCATGGGACAAGACCCTTCGTCTGTGGGATCTTGCAGCTGGCAAGACTACCCGTCGC 300
 G S W D K T L R L W D L A A G K T T R R 100
 TTTGAGGACCACACAAAGGATGTGCTCTCTGTTGCTTTTCAGTGCTGATAACCGTCAGATT 360
 F E D H T K D V L S V A F S A D N R Q I 120
 GTGTCTGGCTCCCGTGACAAAACCATCAAGCTGTGGAATACACTTGCCCAGTGCAAATAC 420

V S G S R D K T I K L W N T L A Q C K Y 140
 ACAATCCAGGAGGATGGTCACTCTGACTGGGTGTCCTGCGTAAGGTTCTCTCCCTCCAAC 480
 T I Q E D G H S D W V S C V R F S P S N 160
 AGTAACCCCATCATTTGTATCATGTGGATGGGACAAGGCTGTCAAGGTATGGAGCCTGACC 540
 S N P I I V S C G W D K A V K V W S L T 180
 AACTGCAAGCTCAAGACCAACCACACTATGGACACACTGGTTACTTGAATACAGTTACTGTC 600
 N C K L K T N H Y G H T G Y L N T V T V 200
 TCTCCTGATGGCTCCCTCTGTGCCTCTGGTGGCAAGGATGCTAAGGCCATGCTTTGGGAT 660
 S P D G S L C A S G G K D A K A M L W D 220
 TTGAATGATGACAAGCATCTGTACACTTTGGACCACACTGATATCATCAACTCGCTGTGC 720
 L N D D K H L Y T L D H T D I I N S L C 240
 TTCAGCCCCAACCGTTATTGGCTGTGTGCCGCTACTGGCCCATCTATCAAGATTTGGGAT 780
 F S P N R Y W L C A A T G P S I K I W D 260
 TTGGAAGGCAAGAATATGGTCGATGAATTGAAGCCCGATGTGATTACCCAGAACCCTAAG 840
 L E G K N M V D E L K P D V I T Q N P K 280
 GCTGAACCCCCACAGTGTCTCTCCATGGCCTGGTCTGCAGATGGGCAAACCTCTGTTTGCT 900
 A E P P Q C L S M A W S A D G Q T L F A 300
 GGTTCAGTGACAGCAAGATCCGTGTCTGGCAGGTCAGCGTTACTTCCCCGTGCGT**AAGGG** 960
 G Y S D S K I R V W Q V S V T S R A * 318
 AATGTTCTGGAGTGCTGC**AATAAA**GATTGCTTGGTG**AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA**

รูปที่ 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ Pm-RACK1 ซึ่งอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ตรงกับ
 accession no. EF569136

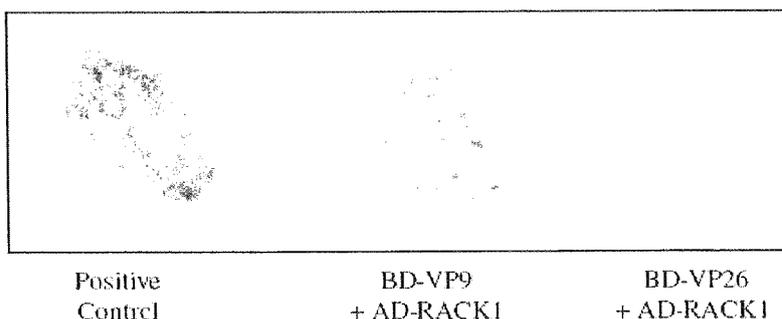
	WD1	
Pm-RACK1	: MNESLQLRGTLVGHNGWVTQIATNRNFPDMILSASRDKSLILWKLTRDE-NNYGVFPQKRL	: 59
Fruitfly	: MSETLQLRGTLIGHNGWVTQIATNPKDPDTIISASRDKTLIVWKLTRDEDYNYGVFPQKRL	: 60
Human	: MTEQMTLRGTLKGNHNGWVTQIATTPQFPDMILSASRDKTIIMWKLTRDE-TNYGIPQRAL	: 59
	WD2	WD3
Pm-RACK1	: HQHSHFITDVLVSLDGHFALSGSWDKTLRLWDLAACKTTRRFEDHTKDVLSVAFSADNRQ	: 119
Fruitfly	: YGHSHFISDVLVSSDGNALSGSWDQTLRLWDLAAGKTRRFEGHTKDVLSVAFSADNRQ	: 120
Human	: RGHSHFVSDVVTSSDQGFALSGSWDGLRLWDLTTGTTTRRFVGHTKDVLSVAFSSDNRQ	: 119
	WD4	
Pm-RACK1	: IVSGSRDKTIKLNWTLAQCKYTIQEDGHSWVSCVRFSPNSNPIIVSCGWDKAVKVVNSL	: 179
Fruitfly	: IVSGSRDKTIKLNWTLAECCKFTIQEDGHTDWSVSCVRFSPNHSNPIIVSCGWDRTVKVVNSL	: 180
Human	: IVSGSRDKTIKLNWTLGVCKYTVQDESHSWVSCVRFSPNHSNPIIVSCGWDKLVKVVNSL	: 179
	WD5	
Pm-RACK1	: TNCKLKTNHYGHHTGYLNTVTVSPDGSILCASGGKDAKAMLELNDGKHLTYLGHDTDIINSL	: 239
Fruitfly	: ANCKLKNNBHGHNGYLNFTVTVSPDGSILCTSGGKDSKALLWELNDGKHLTYLGHNDIINAL	: 240
Human	: ANCKLKTNHIGHHTGYLNTVTVSPDGSILCASGGKGGQAMLELWELFNEGKHLTYLGGGDIINAL	: 239
	WD6	WD7
Pm-RACK1	: CFSPNRYWLCAATGPSIKIKDLLEGKIMVDELKQDVITQNPKAEPQCLSMWASADGGTFLF	: 299
Fruitfly	: CFSPNRYWLCVAYGPSIKIKDLACEKTVEELRPEVVSPTSADQPOCLSLAWSADGGTFLF	: 300
Human	: CFSPNRYWLCAATGPSIKIKDLLEGKIVDELKQEVISTSSKAEPQCTSLAWSADGGTFLF	: 299
		
Pm-RACK1	: AGYSDEKIRVWQVSVTSRA	: 318
Fruitfly	: AGYSDNTRVWQVSVSAH-	: 318
Human	: AGYTDNLVVRVWQVTFGR	: 317

รูปที่ 8 ผลของการทำ Multiple sequence alignment โดยเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ Pm-RACK1 กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ซึ่งได้แก่ human-RACK1 (*Homo sapiens*, BAD96208) และ fruit fly-RACK1 (*Drosophila melanogaster*, NP477269) บริเวณโดเมน WD40 ทั้ง 7 บริเวณแสดงด้วยกรอบสี่เหลี่ยม กรดอะมิโนที่ขีดเส้นใต้แสดงกรดอะมิโนที่อนุรักษ์ไว้ในแต่ละ WD domain

2. ปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน Pm-RACK1 กับ VP9 ในยีสต์

จากการใช้เทคนิค yeast two-hybrid screening เพื่อศึกษาการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน Pm-RACK1 และโปรตีน VP9, VP26 พบว่าพลาสมิดลูกผสม AD-RACK1 และ BD-VP9 สามารถโตได้ในอาหารที่ขาดเลือก ที่ไม่มีกรดอะมิโนฮิสติดีน ลิวซีน ทรีปโตเฟนและอะตีซีน เมื่อวิเคราะห์ด้วย colony-lift assay สังเกตเห็นโคโลนีเป็นสีฟ้าบนกระดาษกรองเหมือนโคโลนีใน positive control (pGBKT7-53 + pGADT7-T) และไม่เปลี่ยนสีใน negative control (BD-VP26+AD-RACK1) ดังแสดงในรูปที่ 9 ซึ่งเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ β -galactosidase จากนั้นสกัดพลาสมิดลูกผสมจาก positive clone เพื่อทำ PCR โดยพบว่าพลาสมิดทั้งสองอยู่จริงรวมทั้งได้มีการแยกพลาสมิดดังกล่าวเพื่อยืนยันลำดับเบสของ

ยื่นอีกครั้ง จากการทดลองเบื้องต้นสามารถสรุปได้ว่าโปรตีน Pm-RACK1 มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน VP9 ซึ่ง VP9 เป็น nonstructural protein ของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่มีความสำคัญและจำเป็นสำหรับการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) การผลิตอนุภาคต่างๆ ของไวรัส และการยับยั้งหน้าที่ของเซลล์เจ้าบ้าน (Liu et al., 2006) และในสิ่งมีชีวิตอื่นพบว่า RACK1 สามารถมี interaction กับโปรตีนต่างๆของไวรัสได้เช่นกัน เช่น จับกับโปรตีน E1A ซึ่งเป็นโปรตีนของไวรัส adenovirus (Sang et al., 2001) โปรตีน M1 ของไวรัส influenza A (Reinhardt and Wolff, 2000) โปรตีน Orf B ของ walley dermal sarcoma virus (Daniels et al., 2008)



รูปที่ 9 การเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน Pm-RACK1 และโปรตีน VP9 ในยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ AH109 โดยพลาสมิดลูกผสม BD-VP9 และ AD-RACK1 สามารถเปลี่ยนเป็นสีฟ้าบนกระดาษกรองได้ ด้วยวิธี colony lift assay

3. การยืนยันผลการมีปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน Pm-RACK1 และ VP9 ในหลอดทดลอง (*In vitro*)

การทำ GST-pull-down ได้มีการผลิต recombinant Pm-RACK1 ด้วย expression vector ที่มี 6xHis เป็นตัวติดตาม ส่วน VP9 ได้โคลนเข้า pGEX-4T-1 ซึ่งเป็น expression vector ที่มีการแสดงออกของ GST fusion protein เมื่อได้ recombinant protein ทั้ง 2 ชนิดแล้วได้ทำ GST pull down เพื่อยืนยันผลการจับกันของโปรตีน 6xHis-RACK1 และ GST-VP9 พบว่าโปรตีน 6X His- RACK1 สามารถจับกับโปรตีน GST-VP9 ได้โดยแสดงแถบโปรตีนในช่องที่ 3 และ 6 แต่ไม่สามารถจับกับโปรตีน GST ได้โดยใช้ Anti-His Tag antibody และ Anti-GST antibody ในช่องที่ 2 และ 5 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 10

	Anti-His			Anti-GST		
	1	2	3	4	5	6
GST	-	-	+	-	-	+
GST-VP9	-	+	-	+	+	-
6xHis-RACK1	+	+	+	-	+	+

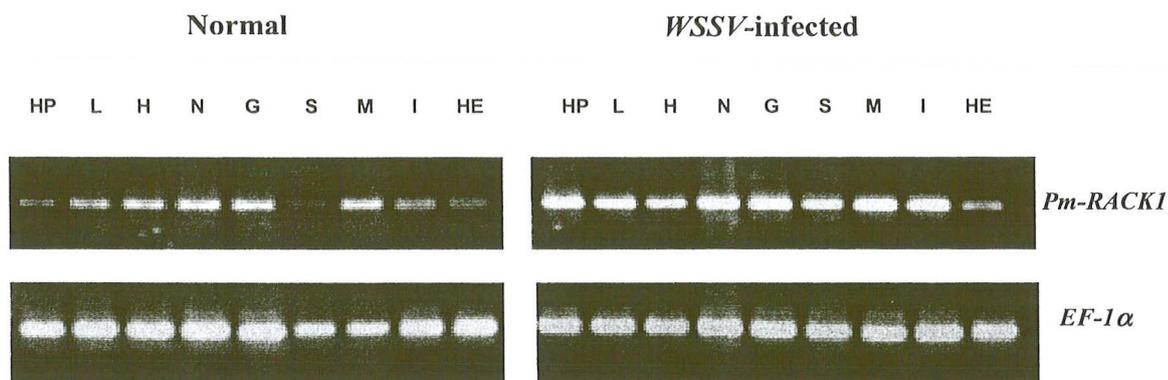
รูป

รูปที่ 10 ผลการจับกันของโปรตีน Pm-RACK1 และ VP9 โดยการทำให้ GST-pull-down แถวที่ 1-3เป็นการตรวจสอบโปรตีน Pm-RACK1 ด้วย Anti-His Tag antibody แถวที่ 4-6 ตรวจสอบโปรตีน GST-VP9 และ โปรตีน GST ด้วย Anti-GST antibody แถวที่ 1 และ 4 เป็นโปรตีน Pm-RACK1 และ VP9 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาแล้วซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมในการตรวจสอบ antibody แถวที่ 2 และ 5 แสดงการจับกันของโปรตีน Pm-RACK1 และ VP9 โดยใช้ antibody ในการตรวจสอบ

4. การศึกษาการแสดงออกของยีน *Pm-RACK1* ในอวัยวะต่างๆของกิ้งกัที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

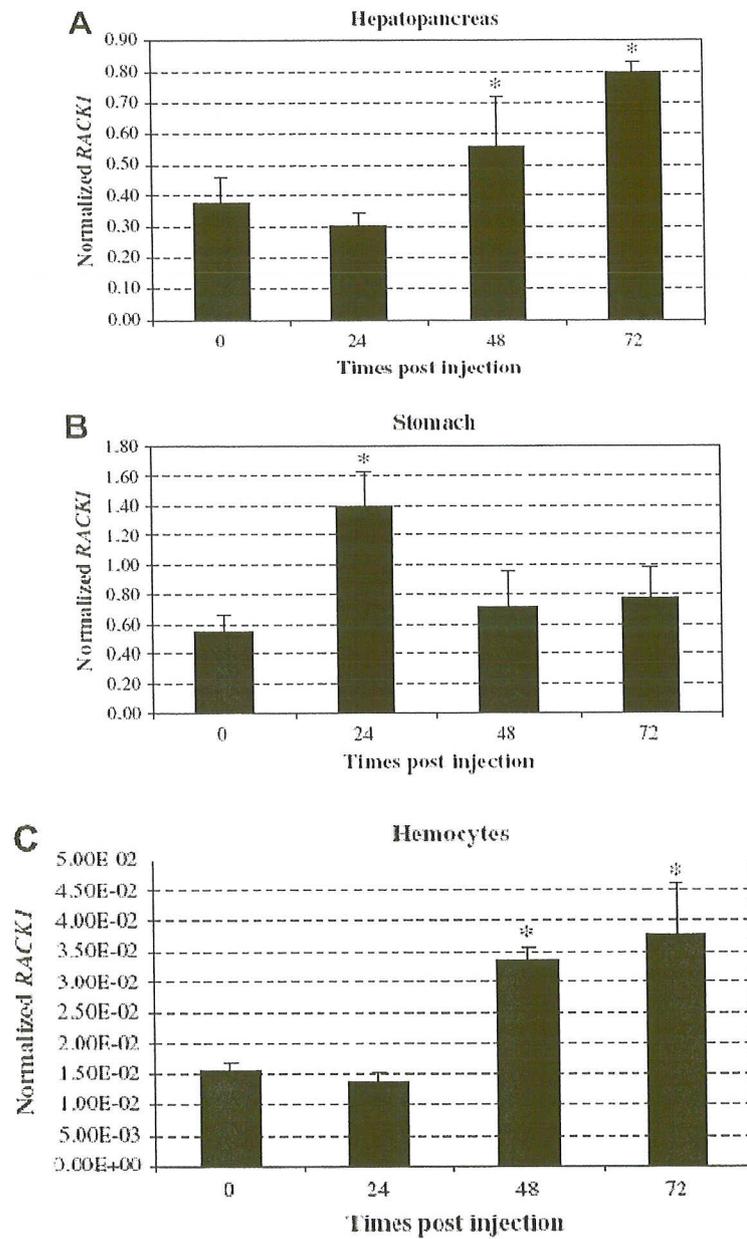
จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *Pm-RACK1* ในอวัยวะต่างๆของกิ้งกัที่ติดเชื้อเปรียบเทียบกับกิ้งกัปกติด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า *Pm-RACK1* มีการแสดงออกในทุกอวัยวะของกิ้งกัและพบการแสดงออกที่สูงขึ้นในกิ้งกัที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในหลายอวัยวะ เช่น hepatopancreas hemocytes และ stomach เป็นต้น ดังแสดงในรูปที่ 11 และเมื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *Pm-RACK1* ในอวัยวะ hepatopancreas stomach และ hemocytes ของกิ้งกัหลังจากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เวลา 0 24 48 และ 72 ชั่วโมง โดยการทำให้ Real-time PCR พบการแสดงออกที่สูงขึ้นในอวัยวะ

hepatopancreas และ hemocytes ของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง และในอวัยวะ stomach พบการแสดงออกที่สูงขึ้นที่เวลา 24 ชั่วโมง หลังจากการติดเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 12 *Pm-RACK1* จึงอาจมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อของกุ้งกุลาดำ จากรายงานที่ผ่านมาพบการแสดงออกที่สูงขึ้นของ *RACK1* ในเซลล์มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ใหญ่ของคน และกระบวนการ angiogenesis ซึ่งเป็นกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ของก้อนมะเร็ง (Berns et al., 2000)



รูปที่ 11 การแสดงออกของยีน *Pm-RACK1* ในอวัยวะต่างๆของกุ้งปกติ (Normal) และกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV infection) โดยเทคนิค RT-PCR HP=hepatopancreas L=lymphoid H =heart N=nerve G=gill S=stomach; M=muscle I =intestine และ HE=hemocytes





รูปที่ 12 การแสดงออกของยีน *Pm-RACK1* เทียบกับยีนอ้างอิงในอวัยวะ (A) Hepatopancreas (B) stomach และ (C) Hemocytes ของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เวลา 0 24 48 และ 72 ชั่วโมง โดยเทคนิค Real-time PCR