วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมดีเอ็นเอเส้นสมบูรณ์ของ *Pm-RACK1* โดยการทำ 3'-RACE (rapid amplification of cDNA ends)

จากข้อมูลลำดับเบสของ *Pm-RACK1* ในฐานข้อมูล EST (accession no. 901383) พบว่า ลำดับเบสทางด้านปลาย 3' ยังไม่สมบูรณ์ จึงเตรียมดีเอ็นเอเส้นสมบูรณ์โดยการทำ 3'-RACE ตามขั้นตอน GeneRacer™ kit ของบริษัท Invitrogen โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *Pm-RACK1* (GSP1, 5'-GGTACTCTCCCTCCAACAGTAACC-3' และๆ adaptor primer 1 จากบริษัท และทำ Nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ GSP2, 5'-GCTCAAGACCAACCACTATGGACA-3' และ adaptor primer 2 จากบริษัท ทำการโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้เข้าสู่เวกเตอร์ pGEM-T Easy เพื่อตรวจสอบลำดับเบสและวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้ด้วยโปรแกรม Blast

2. โคลนยีน *Pm-RACK1* และ RACK1 interacting protein (RIP) เข้าสู่ยีสต์เวคเตอร์

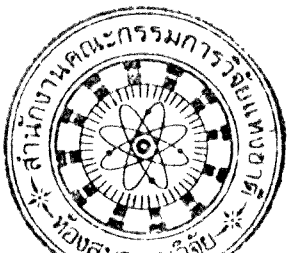
โคลนดีเอ็นเอเส้นสมบูรณ์ของยีน *Pm-RACK1* เข้าสู่เวกเตอร์ pGADT7 และโคลนยีนของไวรัสตัวแดงดวงขาว *VP9* และ *VP26* เข้าสู่เวกเตอร์ pGBKT7 โดยมีจุดตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ปลาย 5' และปลาย 3' และถ่ายโอน พลาสมิดที่มียีน *RACK1 VP26* และ *VP9* เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* Top10F' เพื่อคัดเลือกโคลนและตรวจสอบลำดับเบส

3. ศึกษาการมีปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน *Pm-RACK1* และ VP9 ในยีสต์ (Yeast two-hybrid assay)

นำพลาสมิดลูกผสม AD-RACK1 BD-VP26 และ BD-VP9 ที่ผ่านการตรวจสอบลำดับเบสแล้วมาทำให้บริสุทธ์ด้วย QIA prep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) ทำการถ่ายโอน พลาสมิดลูกผสม AD-RACK1 และ BD-VP9, AD-RACK1 และ BD-VP26 เข้าสู่เซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ AH109 โดยใช้ LiOAc ช่วยให้เซลล์ยีสต์เป็นรูพรุนเพื่อให้พลาสมิดเข้าสู่เซลล์ได้ และทำการคัดเลือก positive clone ที่สามารถโตได้ในอาหารที่ใช้คัดเลือก (selective medium) ที่ไม่มีกรดอะมิโนฮิสติดีน ลิวซีน ทริปโตเฟนและอะดีนีน จากนั้นนำมาทดสอบกิจกรรมของ ß-galactosidase โดยวิธีการ colony lift assay โดยทำการเพิ่มจำนวนเซลล์ยีสต์ที่เป็น positive clone บนอาหารแข็งที่ไม่มีกรดอะมิโนฮิสติดีน ลิวซีน ทริปโตเฟนและอะดีนีน จากนั้นนำแผ่น membrane ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาวางบนอาหาร จากนั้นจึงดึงแผ่น membraneนั้นมาผ่านการทำให้เซลล์แตกด้วยไนโตรเจนเหลว จากนั้นเติม Z buffer/X-gal solution ลงบน membrane ขั้นตอนนี้จะต้องทำในที่มืด บ่ม membrane ที่อุณหภูมิ 30 ^{o}C รอจนปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์แล้วจึงทำการหยุดปฏิกิริยาและทำให้แผ่น membrane แห้ง

4. โคลนยีน *Pm-RACK1* และ VP9 เข้าสู่เวคเตอร์ pQE40 และ pGEX -4T-1

โคลนยีน *Pm -RACK1* เข้าสู่เวกเตอร์ pQE-40 และโคลน *VP9* เข้าสู่เวกเตอร์ pGEX-4T-1 ผลิตโปรตีนลูกผสมทั้งสองในเซลล์แบคทีเรีย โดยใช้ 5 mM isopropyl-β- D-thiogalactopyranoside (IPTG)



ชักนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน 6X His- RACK1 และ GST-VP9 ทำให้เซลล์แตกด้วยสารละลาย lysis buffer ที่ประกอบด้วยสารละลายของ protease inhibitor และ triton X-100 จากนั้นทำบริสุทธิ์โปรตีน 6X His- RACK1 และ GST-VP9

5.ตรวจสอบการมีปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน Pm-RACK1 และ VP9 ในหลอดทดลอง (GST pull-down*)*

นำโปรตีน GST-VP9 หรือโปรตีน GST บ่มกับ glutathione sepharose 4B beads เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง เติมโปรตีน 6X His- RACK1 บ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ทำการล้าง bead ด้วย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 จากนั้นโปรตีนจะถูกชะออกมาด้วย SDS sample buffer นำโปรตีนมาวิเคราะห์ด้วย 12% โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส (SDS-PAGE) และทำ western blot assay โดยย้ายโปรตีนลงบนแผ่นเมมเบรน nitrocellulose และตรวจสอบโปรตีน 6X His-RACK1 ด้วย Anti-His Tag antibody และตรวจสอบโปรตีน VP9 ด้วย Anti-GST antibody เติมซับสเตรตและวิเคราะห์ผลการจับกันของโปรตีนบนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์

6. การเตรียมเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

แยกส่วนเหงือก หัวใจ และน้ำเหลืองของกุ้งที่ติดเชื้อแล้วบดให้ละเอียดในอาหารเลี้ยงเชื้อ K-199 โดยใช้อัตราส่วนน้ำหนักเนื้อเยื่อกุ้ง 1 กรัม ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ K-199 1 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงแยกส่วนใส แล้วกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน นำสารละลายที่ได้ไปทดสอบความรุนแรง โดยการหาอัตราความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งตาย 50 % ในระยะเวลา 3-5 วัน นำสารละลายดังกล่าวไปใช้ในการทดลอง

7. การศึกษาการแสดงออกของยีน *Pm-RACK1* ในอวัยวะต่าง ๆของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเปรียบเทียบกับกุ้งปกติโดยเทคนิค RT-PCR

นำกุ้งที่มีน้ำหนัก 10-15 กรัม ฉีดด้วยเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เตรียมไว้และแยกอวัยวะต่างๆ ของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว สกัดอาร์เอ็นเอจากเนื้อเยื่อกุ้งโดยใช้สารละลาย Trizol ตามวิธีของบริษัท Invitrogen นำอาร์เอ็นเอที่ได้เปลี่ยนเป็น cDNA โดยใช้เอนไซม์ Superscript ^{TM}III Reverse Transcriptase (Invitrogen) นำ cDNA ที่ได้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการศึกษาการแสดงออกของยีน *Pm-RACK1* โดยการทำ PCR

8. การศึกษาการแสดงออกของยีน *Pm-RACK1* ในอวัยวะต่าง ๆของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เวลาต่าง ๆโดยเทคนิค Real-time PCR

แยกอวัยวะต่างๆของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เวลา 0 24 48 และ 72 ชั่วโมง สกัดอาร์เอ็นเอจากเนื้อเยื่อกุ้ง โดยใช้สารละลาย Trizol นำอาร์เอ็นเอที่ได้เปลี่ยนเป็น cDNA โดยใช้เอนไซม์ Superscript ^{TM}III Reverse Transcriptase (Invitrogen) และนำ cDNA ที่ได้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ Real-time PCR โดยใช้ SYBR Green เป็นสารติดตามผลการแสดงออกของยีน