MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF *PENAEUS MONODON* LOQUACIOUS cDNA

PIPOP SAEJIA 5237182 MBMG/M

M.Sc. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: CHALERMPORN ONGVARRASOPONE, Ph.D., SAKOL PANYIM, Ph.D., APINUNT UDOMKIT, Ph.D.

ABSTRACT

RNA interference (RNAi) plays an important role in an antiviral defense in shrimp. RNAi technology has been extensively used for inhibition of viral replication and studying gene function. To gain more insights to the RNAi mechanism, Dicer binding proteins, Loquacious (Loqs) and R2D2 have been shown to be required for an efficient in RNAi silencing activity. Therefore, the objectives of this study were to clone the full length cDNA of PmLoqs and characterize its function in the RNAi pathway. The full length cDNA of PmLoqs consists of 1,464 bp encoding 323 amino acids. PmLoqs consists of 3 double stranded RNA binding domains (dsRBD). Phylogenetic analysis demonstrated that PmLoqs is in the group of arthropods. In order to study the function of PmLoqs in *P.monodon*, knockdown PmLoqs by using dsRNA-PmLoqs was performed. Expression of PmLoqs can be suppressed approximately 85% after 3 days dsRNA-PmLoqs injection. Suppression of PmLoqs increased the efficiency of dsRNA-PmRab7 to inhibit an endogenous PmRab7 expression. Moreover, inhibitory effect of PmLoqs was demonstrated to have an increase in the ability of dsRNA-YHV to inhibit yellow head virus (YHV) replication after 48 and 72 hours post YHV challenge. These results indicated that an increase in the ability of dsRNA to silence gene expression is the result of the inhibition of PmLoqs. Taken together, these results suggested that PmLoqs is involved in dsRNA-mediated gene silencing in shrimp.

KEY WORDS: LOQUACIOUS (LOQS)/ DOUBLE STRANDED RNA BINDING PROTEIN /dsRNA-PmRab7/ dsRNA-YHV (PRO)/ dsRNA-PmLoqs

84 pages

การโคลนและการศึกษาหน้าที่การทำงานของยีนโลเควเชียสในกุ้งกุลาดำ

MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF *PENAEUS MONODON* LOQUACIOUS cDNA

พิภพ แซ่เจี่ย 5237182 MBMG/M

วท.ม. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : เฉลิมพร องศ์วรโสภณ, Ph.D., สกล พันธุ์ยิ้ม, Ph.D., อภินันท์ อุดมกิจ, Ph.D.

บทคัดย่อ

กระบวนการอาร์เอ็นเออินเตอร์เฟียแรนซ์ (อาร์เอ็นเอไอ) มีบทบาทสำคัญต่อกลไกการต้านไวรัสในกุ้ง เทคโนโลยีอาร์เอ็นเอไอได้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสและใช้ในการศึกษาหน้าที่การทำงานของยีนในกุ้ง เพื่อให้เข้าใจกลไกการทำงานของอาร์เอ็นเอไอให้มากขึ้น ได้มีการศึกษาโปรตีนที่จับกับเอ็นไซม์ไดเซอร์ ซึ่งได้แก่โลเควเชียส และ R2D2 พบว่า โปรตีนทั้ง 2 นี้ จำเป็นต่อประสิทธิภาพในการทำงานของเอ็นไซม์ไดเซอร์ ในกระบวนการอาร์เอ็นเอไอซึ่งมีผลต่อการยังยั้งการแสดงออกของยีน ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการโคลน cDNA ของยีนโลเควเชียสอย่างสมบูรณ์ และศึกษาหน้าที่การทำงานของยีนโลเควเชียสที่เกี่ยวข้องอยู่ในกระบวนการอาร์เอ็นเอไอในกุ้ง ผลการศึกษาพบว่าลำดับข้อมูลของยีนโลเควเชียสอย่างสมบูรณ์ประกอบไปด้วย 1,464 นิวคลีโอไทด์ สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนได้จำนวน 323 ตัว ยีนโลเควเชียสในกุ้งกุลาดำประกอบไปด้วย 3 โดเมนของอาร์เอ็นเอสายคู่ จากการวิเคราะห์แสดงให้เห็นถึงวงศ์วานวิวัฒนาการของยีนโลเควเชียสในกุ้งกุลาดำ ถูกจัดให้อยู่ในจำพวกเดียวกับแมลง ในการศึกษาหน้าที่การทำงานของยีนโลเควเชียสในกุ้งกุลาดำ โดยใช้อาร์เอ็นเอสายคู่ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีนโลเควเชียสในกุ้งกุลาดำพบว่า การแสดงออกของยีนโลเควเชียสสามารถที่จะถูกยับยั้งได้ประมาณ 85% ภายในระยะเวลา 3 วัน หลังจากได้รับอาร์เอ็นเอสายคู่ ทั้งนี้การยับยั้งการแสดงออกของยีนโลเควเชียสในกุ้งกุลาดำ ยังส่งผลในการเพิ่มประสิทธิภาพของอาร์เอ็นเอสายคู่ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีน Rab7 ในการยับยั้งแสดงออกของยีน Rab7 ในกุ้งกุลาดำได้อีกด้วย นอกเหนือจากนี้ยังพบว่า การยับยั้งการแสดงออกของยีนโลเควเชียสยังให้ผลในการเพิ่มประสิทธิภาพของอาร์เอ็นเอสายคู่ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีนของไวรัสหัวเหลืองต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ หลังจากที่ทำการฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่เป็นระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง จากผลการศึกษา สามารถที่จะสรุปได้ว่าการเพิ่มประสิทธิภาพของอาร์เอ็นเอสายคู่ต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีนนั้นเป็นผลเนื่องมาจากการยับยั้งการแสดงออกของยีนโลเควเชียส ผลการทดลองทั้งหมด แสดงให้เห็นว่ายีนโลเควเชียสมีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการยับยั้งการแสดงออกของยีนโดยใช้อาร์เอ็นเอสายคู่ในกุ้งกุลาดำ

84 หน้า