การศึกษาโปรโมเตอร์ของยีน 14-3-3 Zeta ในกุ้งขาวแปซิฟิก

Study of promoter of 14-3-3 Zeta in Pacific white shrimp *(Litopenaeus vannamei)*

วิศรุต ศรีจรรยา (Witsarut Srijunya)* ดร.วราพร วรรณนา (Dr.Warapond Wanna)**

บทคัดย่อ

โปรตีนในตระกูล 14-3-3 เป็นโปรตีนที่มีความอนุรักษ์สูงและมีการแสดงออกในเซลล์ยูคาริโอตทุกชนิด เพื่อศึกษาหน้าที่ของโปรโมเตอร์ของยีน 14-3-3 Zeta ในกุ้ง จึงได้โคลนยีนบริเวณโปรโมเตอร์ของกุ้งขาวแปซิฟิก (Litopenaeus vannamei) ด้วยวิธีโครโมโซมวอคกิ้ง หลังจากการนำโคลนต่างๆไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว ได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน W1433ZDL2Clone2 ไปวิเคราะห์หาคุณสมบัติของโปรโมเตอร์ โดยวิเคราะห์หาบริเวณ core promoter ด้วยโปรแกรม Neural Network Promoter Prediction (NNPP) และ transcription factor binding site ด้วยโปรแกรม AliBaba 2.1, Eukaryotic Core Promoter Predictor (YAPP), SIGSCAN 4.05 และ LASAGNA-Search 2.0 จากการวิเคราะห์พบว่ามีบริเวณ core promoter และมีจุดจับของโปรตีนกลุ่ม transcription factor ที่สำคัญ ได้แก่ CAAT box, TATA box, INR element, GATA-1, Oct-4 ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ W1433ZDL2Clone2 มีความเป็นโปรโมเตอร์ อย่างไรก็ตามคุณสมบัติอื่นๆของโปรโมเตอร์ของยีน 14-3-3 Zeta จำเป็นต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

ABSTRACT

The 14-3-3 proteins are a family of highly conserved and regulatory expressed in all eukaryotic cells. In order to study the promoter function of the 14-3-3 Zeta in shrimp, the promoter region of Pacific white shrimp *(Litopenaeus vannamei)* was investigate by chromosome walking technique. After sequences analysis we picked W1433ZDL2Clone2 to performed promoter characterization. The core promoter was prediction by the Neural Network Promoter Prediction (NNPP) and transcription factor binding sites were analyzed with AliBaba 2.1, Eukaryotic Core Promoter Predictor (YAPP), SIGSCAN 4.05 and LASAGNA-Search 2.0 program. Core promoter and many important transcription factor binding sites such as CAAT box, TATA box, INR element, GATA-1, Oct-4 were found. These finding is indicated W1433ZDL2Clone2 has potential as promoter. However the promoter of 14-3-3 Zeta need to further studies.

คำสำคัญ: โปรโมเตอร์ 14-3-3 กุ้งขาวแปซิฟิก

Key Words: Promoter, 14-3-3, Pacific white shrimp

** นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพโมเลกุลและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์*

*** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพโมเลกุลและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์*

บทนำ

โปรตีน 14-3-3 เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบต่างๆ เช่น การควบคุมกระบวนการหายใจ (redox-regulation) การถอดรหัส (transcription) กระบวนการของอาร์เอ็นเอ (RNA processing) การม้วนพับของโปรตีนและการแบ่งตัวของเซลล์ (protein folding and degradation cell cycle) โปรตีน 14-3-3 มีความอนุรักษ์สูงในสิ่งมีชีวิตพวกยูแคริโอต (Aitken, 2006; Darling et al., 2005) ในกุ้งขาวแปซิฟิกมีการรายงานว่าพบโปรตีน 14-3-3 ไอโซฟอร์ม 2 คือ Epsilon และ Zeta มีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นเมื่อกุ้งติดไวรัส (Graidist, et al., 2010; Wanna et al., 2012)

ในกลไกการแสดงออกของโปรตีนตำแหน่งโปรโมเตอร์มีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากเป็นจุดเริ่มต้นของกระบวนการถอดรหัส (Transcription) โปรโมเตอร์มักจะเป็นดีเอ็นเอที่อยู่ทางด้านปลาย 5′ ของยีน โดยในสิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอตเอนไซม์ RNA polymerase II จะทำงานร่วมกับ Transcription factor ชนิดต่างๆเข้าเกาะบริเวณโปรโมเตอร์เพื่อเริ่มต้นกระบวนการถอดรหัสที่บริเวณ Core promoter (Butler and Kadonaga, 2002) ดังนั้นการศึกษาคุณสมบัติของโปรโมเตอร์ จะทำให้มีความเข้าใจในกระบวนการแสดงออกของโปรตีนมากขึ้น อันเป็นประโยชน์กับการศึกษาและเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแปซิฟิกต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน 14-3-3 Zeta

วิธีการวิจัย

การเตรียมตัวอย่างกุ้ง

เก็บตัวอย่างกุ้งขาวแปซิฟิก *(Litopenaeus vannamei)* ที่ปราศจากการติดเชื้อ ขนาดตัวละ 15-20 กรัม มาเลี้ยงในถังขนาด 500 ลิตร ควบคุมความเค็มของน้ำให้อยู่ที่ 20 ส่วนในพันส่วน (ppt) เติมอากาศอย่างสม่ำเสมอ เลี้ยงด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูปวันละ 2 เวลาเช้า เย็น สุ่มเก็บตัวอย่างกุ้ง ใช้มีดผ่าตัดตัดเอาเฉพาะเนื้อเยื่อสับให้ละเอียด แบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 200 มิลลิกรัม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

การสกัดโครโมโซมกุ้ง

วิธีสกัดโครโมโซมดัดแปลงมาจากวิธีของ (Han and Wang, 2013) นำหลอดตัวอย่างที่เตรียมไว้เติมสารละลาย Extraction buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (10 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 1% SDS, pH 7.5) แล้วเติมสารละลายให้มีความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้ สารละลาย DTT 1 mM สารละลาย Proteinase K 20 µg/mL สารละลาย RNase A 10 mg/mL บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง จากนั้นสกัดดีเอ็นเอตามวิธี Phenol-Chloroform extraction ล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol ทำตะกอนให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น เสร็จแล้วตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธีวัดค่าดูดกลืนแสงและวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส

การสร้างดีเอ็นเอไลบรารี

ทำการสร้างดีเอ็นเอไลบรารีตามวิธีของ Genome walker universal kit (Clontech, USA) โดยนำโครโมโซมกุ้งขาวแปซิฟิก *(Litopenaeus vannamei)* ที่เตรียมไว้แบ่งใส่หลอดทดลอง 4 หลอดสำหรับตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิด ดังนี้ *DraI EcoRV StuI PvuII* บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นเชื่อมต่อเข้ากับ Genome walker adaptor ด้วย T4 DNA ligase บ่มที่ 16 องศาเซลเซียส 16-18 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 5 นาที แล้วเติมน้ำกลั่นลงในแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากัน จะได้ดีเอ็นเอไลบรารีสำหรับทำโครโมโซมวอคกิ้งต่อไป

การโคลนโปรโมเตอร์ด้วยเทคนิคโครโมโซมวอคกิ้ง

ทำการทดลองตามวิธีของ Genome walker universal kit (Clontech, USA) โดยออกแบบไพร์เมอร์ให้จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณปลาย 5′ ของยีน 14-3-3 ไอโซฟอร์ม Zeta ในกุ้งขาวแปซิฟิก (GenBank accession no. EF408929.1) คือ W14-3-3Z Gene Specific Primer 1 (GSP1) 5′-TCGCCAGGAAC TTCTCCGAGCCCCTAC-3′ และ W14-3-3Z Gene Specific Primer 2 (GSP2) 5′-TCGTACCTCTCTGC CTGCTCAGCAAGC-3′ ใช้ดีเอ็นเอไลบรารีแต่ละชนิดเป็นต้นแบบในการทำปฏิริยา Polymerase Chain Reactions (PCR) ซึ่งจะทำ 2 ครั้ง ครั้งแรกเรียกว่า Primary PCR ใช้ไพรเมอร์ W14-3-3Z GSP1 คู่กับ AP1 (Clontech adaptor primer) และกำหนดให้มีสภาวะในการทำปฏิกิริยาดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 25 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 3 นาที 7 รอบ ต่อด้วย 94 องศาเซลเซียส 25 วินาที และ 67 องศาเซลเซียส 3 นาที 32 รอบ และ 67 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ ครั้งที่สองเรียกว่า Secondary PCR โดยจะใช้ผลิตภัณฑ์จาก PCR ครั้งแรกเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ใช้ไพรเมอร์ W14-3-3Z GSP2 คู่กับ AP2 และกำหนดให้มีสภาวะในการทำปฏิกิริยาดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 25 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 3 นาที 5 รอบ ต่อด้วย 94 องศาเซลเซียส 25 วินาที และ 67 องศาเซลเซียส 3 นาที 20 รอบ และ 67 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ ตรวจสอบด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบด้วย 100 bp DNA ladder ทำการโคลนผลิตภัณฑ์ที่ได้เข้าสู่เวคเตอร์ pCR 2.1 (Invitrogen) แล้วส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

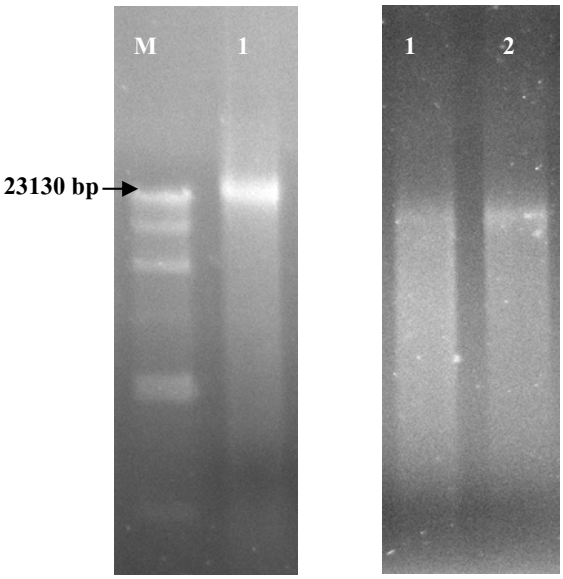
การวิเคราะห์คุณสมบัติของโปรโมเตอร์

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยโปรแกรมทางชีวสารสนเทศ โดยขั้นแรกนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนต่างๆมาวิเคราะห์โดยการทำ Alignment ด้วยโปรแกรม Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) ดูว่ามีส่วนเหมือนกันหรือไม่ ขั้นที่สองวิเคราะห์หา Core promoter ในลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยโปรแกรม Neural Network Promoter Prediction (NNPP) (www.fruitfly .org/seq_tools/promoter.html) ขั้นที่สามนำไปวิเคราะห์หาตำแหน่งเข้าจับของ Transcriptional factor ด้วยโปรแกรม LASAGNA-Search 2.0 (http://biogrid-ead.engr.uconn.edu/lasagna_search/) โปรแกรม AliBaba 2.1 (www.gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2 /index.html) และโปรแกรม SIGSCAN 4.05 (www.bimas.cit.nih.gov/cgibin/molbio/signal) หาตำแหน่งองค์ประกอบของโปรโมเตอร์ด้วยโปรแกรม Eukaryotic Core Promoter Predictor (YAPP) (http://www.bioinformatics.org/yapp/cgi-bin/yapp.cgi)

ผลการวิจัย

ผลการเตรียมดีเอ็นเอไลบรารี

สกัดโครโมโซมจากกล้ามเนื้อของกุ้งขาวแปซิฟิก *Litopenaeus vannamei* ตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis พบว่าโครโมโซมมีขนาดประมาณ 23 กิโลเบส (ภาพที่ 1ก) จากนั้นนำโครโมโซมที่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dra*I *Eco*RV ผลปรากฏว่าเอนไซม์สามารถตัดได้สมบูรณ์ (ภาพที่ 1ข) ตรงตามความต้องการของ Genome walker universal kit (Clontech, USA) แล้วนำดีเอ็นเอที่ตัดแล้วเชื่อมต่อกับ Genome walker adaptor ได้เป็นดีเอ็นไลบรารี



1ก 1ข

ภาพที่ 1 ผลการเตรียมดีเอ็นเอไลบรารี

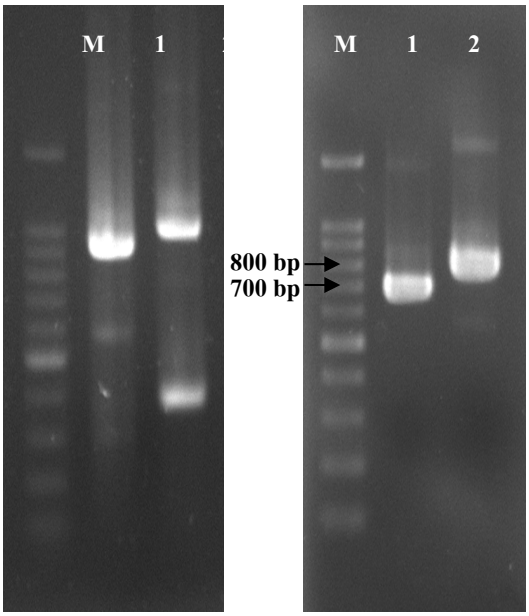
1ก ผลสกัดโครโมโซมจากกล้ามเนื้อของกุ้งขาวแปซิฟิก เลน M : Lambda HindIII Marker, เลน 1 : โครโมโซมกุ้งขาว

1ข ผลการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ เลน 1 : โครโมโซมที่ตัดด้วย *Dra*I, เลน 2 : โครโมโซมที่ตัดด้วย *Eco*RV

ผลการโคลนโปรโมเตอร์ด้วยเทคนิคโครโมโซมวอคกิ้ง

จากผลิตภัณฑ์ของ Secondary PCR พบแถบดีเอ็นเอมีขนาด 700 คู่เบสในดีเอ็นเอไลบรารี *DraI* และขนาดเบส 800 คู่เบสในดีเอ็นเอไลบรารี *EcoRV* (ภาพที่ 2) ได้ทำการโคลนเข้าสู่เวคเตอร์ pCR 2.1 แล้วส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นจำนวน 5 โคลน เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนโดยการทำ Alignment ด้วยโปรแกรม Clustal Omega (Sievers et al., 2011) พบว่าโคลน W1433ZDL2Clone2 มีส่วนประกอบสมบูรณ์ที่สุด

และพบลำดับนิวตลีโอไทด์ของยีน 14-3-3 Zeta บริเวณปลายด้วย โดย W1433ZDL2Clone2 มีขนาด 680 คู่เบส



2ก 2ข

ภาพที่ 2 ผลการทำโครโมโซมวอคกิ้ง

2ก ผล Primary PCR, เลน 1 : ผลิตภัณฑ์จากดีเอ็นเอไลบรารี*Dra*I, เลน 2 : ผลิตภัณฑ์จากดีเอ็นเอไลบรารี *EcoR*V

2ข ผล Secondary PCR , เลน 1 : ผลิตภัณฑ์จากดีเอ็นเอไลบรารี *Dra*I, เลน 2 : ผลิตภัณฑ์จากดีเอ็นเอไลบรารี *EcoR*V ; เลน M : 100 bp Marker

การวิเคราะห์คุณสมบัติของโปรโมเตอร์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน W1433ZDL2Clone2 มาวิเคราะห์หา Core promoter ในลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยโปรแกรม NNPP พบว่าตำแหน่งที่มีความเป็นโปรโมเตอร์สูงที่สุดคือบริเวณคู่เบสที่ 582 - 632 โดยมีคะแนนความเป็นโปรโมเตอร์อยู่ที่ 0.97

ทำการวิเคราะห์หาตำแหน่งเข้าจับของ Transcriptional factor และตำแหน่งองค์ประกอบของโปรโมเตอร์ด้วยโปรแกรม LASAGNA-Search 2.0 โปรแกรม AliBaba 2.1 โปรแกรม SIGSCAN 4.05 โปรแกรม YAPP พบว่ามีองค์ประกอบดังนี้ CAAT box 1 ตำแหน่ง TATA box 3 ตำแหน่ง INR element 1 ตำแหน่ง GATA-1 1 ตำแหน่ง Oct-4 1 ตำแหน่ง เมื่อนำข้อมูลจากโปรแกรมมาวิเคราะห์แล้วได้สร้าง

แผนภาพองค์ประกอบของโปรโมเตอร์ขึ้นดังภาพที่ 3 โดยลูกศรชี้แสดงจุด Transcription start site และเส้นใต้แสดงบริเวณ Core promoter กล่องสี่เหลี่ยมแสดง TATA box CAAT box Octamer binding factor และ GATA binding factor

```
-621 ATCACGAATT GTAATGCAGC ATACTTGCGT CTTTATAATA GTTAAGACCT
-571 TTTTTCCAAC TTGGGATTTG GAAGACCAGA ATACTAAGAG TTTAAACCTC
-521 CTCCTGTTTT ATTCTTATTC AACTTGAAAA TTAACAGGTG TACTACCTAT
-471 GTATTCCATG GTTGGGGAAC GGATGATATG CTTTTGAACA AGTTTGTTAT
-421 AGGGTTAGTA GACAGATGTA AGCGGTTGTT TGCTGCTGGG CTTTTATAAA
        CAAT box
-371 AAAACAATTG AAATATGGTT TTGCTGCGTC ATTTATCTTG TTCTCCCTAA
                                     GATA binding factor
-321 CATTGATTAG CATCTTTTCG GTTGGACCTT GTACGATTGA ATACTAAATA
       Octamer-binding factor
-271 CTGTATTCTT TATTTAGAAT GGCATTGGTG CACATGTTGC ACTCTTTCAT
-221 TTGAATTGTG GATACATTTT ATTGTAATAT TGTTTCGAGA TGGAAAAGGA
-171 ACCTTTCACT ATTGGAGTTA TTTTGAAGAA TGCGAGTGAA GTGGAATTGC
-121 TTGGGTCGAA TGCCCATGAA AGAGTGAATT GACATTGAAT AGTGAGCTGA
 -71 CCTTTTTAAC CATTTGAGGT GATGGATTGC AGGGTAGCAT ATACATAGGC
                                                TATA box
 -21 GGGTAATATG TTCATTCCTT CAGTGCTAGA CTTGAAGTAG TTCAGCCGTT
                                  ↑
 +30 AACGTTTTAT TTCTGTTCTT TCCAGACACA
```

ภาพที่ 3 แผนภาพแสดงองค์ประกอบของโปรโมเตอร์ของยีน 14-3-3 Zeta

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาและโคลนโปรโมเตอร์ของยีน 14-3-3 Zeta จากกุ้งขาวแปซิฟิกด้วยเทคนิคโครโมโซมวอคกิ้ง ได้ผลิตภัณฑ์ของ secondary PCR เป็นจำนวน 5 โคลน เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าโคลน W1433ZDL2Clone2 ซึ่งมีขนาด 680 คู่เบสเป็นการเพิ่มจำนวนมาจากยีน 14-3-3 Zeta จึงนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมทางชีวสารสนเทศต่อดังนี้ โปรแกรม Neural Network Promoter Prediction เพื่อหาบริเวณ Core promoter โดยทำนายจากฐานข้อมูลโปรโมเตอร์ของมนุษย์และแมลงหวี่ (Reese and Eeckman, 1995) มีคะแนนความเป็นโปรโมเตอร์สูงที่สุดคือบริเวณคู่เบสที่ 582 – 632 มีคะแนน 0.97 ซึ่งถือว่าเป็นค่าที่สูง (cutoff 0.80)

ทำการวิเคราะห์หาตำแหน่งเข้าจับของ Transcriptional factor และตำแหน่งองค์ประกอบของโปรโมเตอร์ด้วยโปรแกรม LASAGNA-Search 2.0 (Lee and Huang, 2013) โปรแกรม AliBaba 2.1 (Grabe, 2002) โปรแกรม SIGSCAN 4.05 (Prestridge, 1991) โปรแกรม YAPP โดยทำการบันทึกผลที่ได้ตรงกันอย่างน้อย 3 โปรแกรมเพื่อหลีกเลี่ยงผลที่เป็น false positive พบว่าใน W1433ZDL2Clone2 มีองค์ประกอบดังนี้ ตำแหน่ง TATA box เป็นตำแหน่งจับของโปรตีน TATA binding protein (TBP) มีความสำคัญมากในกระบวนการถอดรหัสของยีนกลุ่มที่สอง (Class II gene) TATA box นี้จะพบในโปรโมเตอร์ของยีนเกือบทุกยีนในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงทุกชนิด (Lewin, 1990) โปรตีน TBP จะเข้าเกี่ยวพันกับสายดีเอ็นเอเพื่อเริ่มต้นการถอดรหัส (Cosma, 2002) ตำแหน่ง CAAT box มีหน้าที่ช่วยให้เอนไซม์ RNA polymerase เข้าจับกับโปรโมเตอร์คล้ายกับ TATA box โดยโปรโมเตอร์ของยีนแต่ละชนิดอาจมี TATA box และ CAAT box ทำงานร่วมกันหรือแยกกันก็ได้ (Lewin, 1990) ตำแหน่ง INR element ทำหน้าที่คล้ายกับ TATA box สามารถทำงานได้อย่างอิสระ (Butler and Kadonaga, 2002) Inr จะทำหน้าที่เป็นตัวกำหนดจุดเริ่มต้นและระดับการแสดงออกในยีนที่ไม่มีโปรโมเตอร์ (Latchman, 1997) ตำแหน่ง GATA-1 เป็นโปรตีนที่อยู่ในตระกูล GATA transcription factor ในมนุษย์ GATA-1 เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์และมะเร็ง(Ohneda and Yamamoto, 2002) ตำแหน่ง Oct-4 เป็น transcription factor ที่จับอยู่กับลำดับ "ATTTGCAT" เป็นโปรตีนอยู่ในตระกูล POU (Petryniak et al., 1990)

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ W1433ZDL2Clone2 มี

คุณสมบัติความเป็นโปรโมเตอร์สูง จึงน่าสนใจที่จะศึกษาแสดงออกของโปรโมเตอร์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและการพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ ของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เอกสารอ้างอิง

Aitken A. 14-3-3 proteins: A historic overview. 14-3-3 Proteins Cancer 2006; 16(3): 162–72.

Butler JEF, Kadonaga JT. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. Genes Dev 2002; 16(20): 2583–92.

Cosma MP. Ordered recruitment: gene-specific mechanism of transcription activation. Mol Cell 2002; 10(2): 227–36.

Darling DL, Yingling J, Wynshaw-Boris A. Role of 14–3–3 proteins in eukaryotic signaling and development. Current Topics in Developmental Biology. Academic Press; 2005; 281–315.

Grabe N. Alibaba2: context specific identification of transcription factor binding sites. In Silico Biol 2002; 2(1): S1–15.

Graidist, P, Phusantisampan T, Wanlem S, Wanna W. Detection of PinX1 and 14-3-3 in the shrimp *(Litopenaeus vannamei)* and study on gene expressions during viral infection and environmental stresses. Songklanakarin J Sci Technol 2010; 32(6): 527–666.

Han F, Wang Z-Y. Cloning and activity analysis of promoter of RanGTPase gene from shrimp, *Marsupenaeus japonicus*: Promoter of RanGTPase gene from shrimp. J World Aquac Soc 2013; 44(6): 860–6.

Latchman DS. Transcription factors: An overview. Int J Biochem Cell Biol 1997; 29(12): 1305–12.

Lee C, Huang C-H. LASAGNA-Search: an integrated web tool for transcription factor binding site search and visualization. BioTechniques 2013; 54(3): 141–53.

Lewin B. Genes IV. Oxford ; New York: Oxford University Press; 1990. 857 p.

Ohneda K, Yamamoto M. Roles of hematopoietic transcription factors GATA-1 and GATA-2 in the development of red blood cell lineage. Acta Haematol. 2002; 108(4): 237–45.

Petryniak B, Staudt LM, Postema CE, McCormack WT, Thompson CB. Characterization of chicken octamer-binding proteins demonstrates that POU domain-containing homeobox transcription factors have been highly conserved during vertebrate evolution. Proc Natl Acad Sci 1990; 87(3): 1099–103.

Prestridge DS. SIGNAL SCAN: a computer program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements. Comput Appl Biosci CABIOS 1991; 7(2): 203–6.

Reese MG, Eeckman FH. Novel neural network algorithms for improved eukaryotic promoter site recognition. Seventh Int Genome Seq Anal Conf. 1995;

Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins DG, Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. Mol Syst Biol 2011; 7: 539.

Wanna W, Thipwong J, Mahakaew W, Phongdara A. Identification and expression analysis of two splice variants of the 14-3-3 epsilon from *Litopenaeus Vannamei* during WSSV infections. Mol Biol Rep 2012; 39(5): 5487–93