การทำบริสุทธิ์ ศึกษาคุณสมบัติและการโคลนยีนของโปรตีนจับลิโพโพลีแซคคาไรด์และเบตา-1,3-กลูแคนจากกุ้งขาว

Purification, characterization and gene cloning of lipopolysaccharide- and β-1,3-glucan-binding protein from *Litopenaeus vannamei*

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทารพันธุ์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

รายงานฉบับสมบูรณ์

ที่ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณคณะวิทยาศาสตร์

ประจำปี 2556-2557

บทคัดย่อ

ในการศึกษานี้ โปรตีนจับลิโพโพลีแซคคาไรด์และเบตา-1,3-กลูแคน (LGBP) ของกุ้งขาว สามารถเกิดปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับแอนติบอดีต่อโปรตีนลูกผสม LGBP ของกุ้งแชบ๊วย จากการวิเคราะห์โดย Western blot พบโปรตีน LGBP เฉพาะในสารสกัดตับของกุ้งขาว โดยไม่พบโปรตีนนี้ในฮีโมลิมฟ์และฮีโมไซท์ ดังนั้นจึงได้ทำบริสุทธิ์ LGBP จากสารสกัดตับของกุ้งขาว โดยคอลัมน์ Q-Sepharose และตามด้วยการทำ Preparative PAGE โปรตีน LGBP บริสุทธิ์ปรากฏเพียงแถบเดียวใน SDS-PAGE ซึ่งมีมวลโมเลกุลเป็น 40.73 kDa โปรตีน LGBP บริสุทธิ์สามารถกระตุ้นแอคทิวิทีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในสารสกัดฮีโมไซท์ และการกระตุ้นเพิ่มมากขึ้นในสภาวะที่มีลิโพโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งดีกว่า lipoteichoic acid และเบตา-1,3-กลูแคน นอกจากนี้โปรตีน LGBP บริสุทธิ์ ยังสามารถเหนี่ยวนำให้แบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* เกิดการเกาะกลุ่มได้ โดยต้องการ Ca^{2+} และมีความจำเพาะต่อน้ำตาล และการจับของ LGBP บริสุทธิ์ กับแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* เกิดได้ดีในสภาวะที่มี Ca^{2+} เช่นกัน ผลการทดลองเหล่านี้บ่งชี้ว่า LGBP ของกุ้งขาวเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันผ่านการเกาะกลุ่มและการจับกับแบคทีเรีย ซึ่งนำไปสู่การกำจัดเชื้อก่อโรคบุกรุกต่อไป

ได้โคลนยีน LGBP จากตับของกุ้งขาวด้วยวิธี RT-PCR และ 5' และ 3' RACE พบว่า cDNA สายเต็มของยีน LGBP ประกอบด้วย 1,282 คู่เบส มี 1 open reading frame ที่ยาว 1,101 คู่เบส ซึ่ง encode สายเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 367 หน่วย มีมวลโมเลกุล 41.6 kDa จากการ BLAST พบ cDNA ของยีน LGBP ของกุ้งขาวเหมือนกับของกุ้งแชบ๊วยมากที่สุด (95%) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี RT-PCR เชิงปริมาณ พบยีน LGBP มีการแสดงออกมากในตับ พบน้อยกว่าในหัวใจและเหงือก เพื่อศึกษาการตอบสนองของยีน LGBP ต่อการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อก่อโรค ทำโดยบ่มชิ้นตับกับ *V. parahaemolyticus* หรือไวรัสตัวแดงดวงขาว พบการแสดงออกของยีน LGBP ในตับเพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดที่ 2.5 - 3 ชั่วโมง หรือ 1 ชั่วโมง หลังการบ่ม ตามลำดับ ผลการทดลองเหล่านี้บ่งชี้ LGBP ถูกกระตุ้นให้เพิ่มขึ้นได้และเกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งเพื่อตอบสนองต่อจุลินทรีย์ก่อโรค

Abstract

In this study, lipopolysaccharide- and β-1,3-glucan-binding protein (LGBP) of *Litopenaeus vannamei* or white shrimp could react specifically with anti-recombinant LGBP protein of *Fenneropenaeus merguiensis* (anti-FmrLGBP) antibody. By Western blot analysis, LGBP protein was only detected in the hepatopancreas extract, none was found in the hemolymph or hemocytes. LGBP was thus purified from the hepatopancreas extract of white shrimp by chromatoghaphy on Q-Sepharose column and subsequently by preparative PAGE. Purified LGBP showed a single protein band with a molecular mass of 40.73 kDa in SDS-PAGE. It could activate phenoloxidase activity in the hemocyte lysate and its activation occurred pronouncedly in the presence of lipopolysaccharide which much better than lipoteichoic acid and β-1,3-glucan. Moreover, purified LGBP could induce the agglutination of *Vibrio parahaemolyticus* with a Ca^{2+}-dependent manner and sugar specificity. Besides, the binding of purified LGBP to *V. parahaemolyticus* was well occurred in the presence of Ca^{2+}. These results indicate that *L. vannamei* LGBP may contribute in the immune respond via the bacterial agglutination or direct binding and leading to further get rid of the invading pathogens.

LGBP gene was also cloned from the hepatopancreas of *L. vannamei* by means of reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and 5' and 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE). The full-length cDNA of LGBP gene consisted of 1,282 bp with one 1,101 bp open reading frame, encoding 367 amino acids. The molecular mass was estimated to be 41.6 kDa. By BLAST analysis, *L. vannamei* LGBP cDNA showed close identity to that of *F. merguiensis* (95%). RT-PCR analysis revealed that LGBP transcript was expressed mainly in the hepatopancreas, less in heart and gills. To study the response of LGBP gene in pathogenic challenge, the hepatopancreas fragments were incubated with *V. parahaemolyticus* or white spot syndrome virus (WSSV). A semiquantitative RT-PCR demonstrated that the expression of LGBP increased and reached the maximum at 2.5 -3 h or 1 h post-incubation with bacterium or WSSV, respectively. Taken together, these results indicate that LGBP is up-regulated and involved in a shrimp immune response against pathogens.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง "การทำบริสุทธิ์ ศึกษาคุณสมบัติและการโคลนยีนของโปรตีนจับลิโพโพลีแซคคาไรด์และเบตา-1,3-กลูแคนจากกุ้งขาว" นี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2556-2557 ผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เป็นอย่างสูงที่ได้อนุญาตให้ใช้สถานที่วางถังน้ำทะเลเพื่อเลี้ยงกุ้งในการทดลอง และขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้เอื้อเฟื้อเครื่องมือต่าง ๆ เพื่อทำให้งานวิจัยดำเนินลุล่วงไปด้วยดี ผลงานวิจัยนี้ส่วนหนึ่งได้รับการตีพิมพ์แบบ Proceeding ในที่ประชุมทางวิชาการระดับชาติและระดับนานาชาติแล้วและกำลังอยู่ในระหว่างการเตรียมต้นฉบับเพื่อตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ งานวิจัยนี้ขออุทิศแด่สัตว์ทดลองทุกชีวิต

ประภาพร อุทารพันธุ์

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	2
Abstract	3
กิตติกรรมประกาศ	4
สารบัญเรื่อง	5
สารบัญตาราง	6
สารบัญรูป	6
สัญลักษณ์และคำย่อ	7
บทนำ	8
วัตถุประสงค์	11
วิธีดำเนินการวิจัย	11
ผลการวิจัยและวิจารณ์	16
สรุปผลการวิจัย	31
เอกสารอ้างอิง	32

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	Purification of LGBP from the hepatopancreas extract	19

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	Electrophoretic protein pattern of LGBP	17
2	Protein pattern in 12% SDS-PAGE and Western blotting	17
3	Purification of LGBP from the hepatopancreas extract by Q-Sepharose column	20
4	Protein patterns at each purification step analyzed by 12% SDS-PAGE and Western blotting	20
5	Standard graph for M_r determination analyzed by 12% SDS-PAGE	22
6	Bacterial agglutination by purified LGBP	25
7	Binding of purified LGBP to *V. parahaemolyticus*	27
8	Cloning strategy and structure of the full-length cDNA of LGBP gene	28
9	RT-PCR analysis of the expression of LGBP mRNA in different tissues	29
10	Expression of LGBP mRNA in the hepatopancreas fragments of *L. vannamei* at different time intervals in response to challenge with *V. parahaemolyticus* or WSSV	30

สัญลักษณ์และคำย่อ

°ซ	=	องศาเซลเซียส
A	=	absorbance
BG	=	beta-1,3-glucan
BSA	=	bovine serum albumin
CAC	=	cacodylate buffer (10 mM sodium cacodylate, pH 8)
g	=	gram
HEPES	=	N-2-hydroxyethylpiperazine-N-ethanesulfonic acid
L-DOPA	=	3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine
LGBP	=	lipopolysac-charide-and β-1,3-glucan-binding protein
LPS	=	lipopolysaccharide
LTA	=	lipoteichoic acid
M	=	molar
mA	=	milliampere
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	milliliter
mM	=	millimolar
M_r	=	apparent molecular weight
ng	=	nanogram
ORF	=	open reading frame
PAGE	=	polyacrylamide gel electrophoresis
SDS	=	sodium dodecyl sulphate
TB	=	Tris buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5)
TBS	=	Tris buffer saline (50 mM Tris-HCl, pH 7.5-0.15 M NaCl)
Tris	=	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
µg	=	microgram
µl	=	microliter

บทนำ

การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลเป็นอุตสาหกรรมที่สำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย กุ้งทะเลเป็นกุ้งเศรษฐกิจที่สำคัญเนื่องจากเป็นที่นิยมของผู้บริโภคทั้งภายในและต่างประเทศ ประเทศไทยได้มีการพัฒนาเทคนิควิธีการเพาะเลี้ยงจนสามารถเลี้ยงกุ้งในระบบหนาแน่นได้ กุ้งที่นิยมเพาะเลี้ยงในประเทศไทยในขณะนี้คือ กุ้งขาว (Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*) ซึ่งมีการนำเข้าแม่พันธุ์กุ้งขาวจากต่างประเทศ มาเพาะเลี้ยงแทนกุ้งกุลาดำ (*Penaeus momodon*) ที่มีการติดเชื้อก่อโรคจนทำให้ผลผลิตลดลงอย่างมาก ไม่คุ้มต่อการลงทุน นอกเหนือจากการติดโรคระบาดแล้ว การเลี้ยงกุ้งในระบบหนาแน่นมักส่งผลกระทบทำให้การเจริญเติบโตของกุ้งลดลง เกิดความเครียด อ่อนแอ และสามารถติดโรคได้ง่าย แบคทีเรียสายพันธุ์หลักที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำในประเทศไทยคือ *Vibrio* species โดยเฉพาะ *Vibrio harveyi* เมื่อกุ้งได้รับเชื้อนี้จะเกิดเป็นโรคเรืองแสงและตายในที่สุด แต่ก็ยังไม่มีรายงานการติดโรคเรืองแสงในกุ้งขาวที่เพาะเลี้ยง นอกจากนี้ยังมีไวรัสที่แพร่ระบาดโดยทำให้กุ้งเกิดโรคคือไวรัสโรคตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus, WSSV) ในหลายปีแรกที่ได้มีการเพาะเลี้ยงกุ้งขาว พบว่ามีผลผลิตทำเงินให้กับประเทศอย่างมากมาย แต่ขณะนี้เริ่มมีรายงานการเกิดโรคระบาดด้วยโรคตายด่วน (EMS, early mortality syndrome) ของกุ้งขาว ซึ่งยังอยู่ในระหว่างการทำวิจัยเพื่อหาสาเหตุที่แน่ชัด แต่รายงานเบื้องต้นพบว่าน่าจะมาจากเชื้อแบคทีเรียและไวรัส ปัจจุบันโรคระบาดก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก การศึกษาโปรตีนที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองจากเชื้อก่อโรคของกุ้งจึงมีความสำคัญในการเตรียมความพร้อมต่อการเพาะเลี้ยงกุ้ง แทนการใช้ยาและสารเคมี ด้วยเหตุนี้งานวิจัยจึงได้สนใจศึกษากลไกการป้องกันตนเองของกุ้งมากขึ้นเพื่อใช้เป็นแนวทางในการป้องกันการติดเชื้อก่อโรคต่อไป

กุ้งเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่มครัสเตเชียน (crustacean) มีระบบไหลเวียนเลือดที่เรียกว่าฮีโมลิมฟ์ (hemolymph) เป็นแบบเปิด ครัสเตเชียนไม่มีการสร้างแอนติบอดี (antibody) ต่อสิ่งแปลกปลอมเหมือนสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง แต่มีระบบกลไกการป้องกันตนเองที่เรียกว่า innate immune system เพื่อป้องกันสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุก ระบบป้องกันตนเองของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังอาศัยเซลล์และสารน้ำ ระบบอิมมูนที่อาศัยเซลล์ (cellular immunity) ประกอบด้วยการทำงานของเม็ดเลือดหรือเซลล์ฮีโมไซท์ (hemocyte) ได้แก่การกลืนกิน (phagocytosis) การเกิดโนดูล (nodule formation) และการกักล้อม (encapsulation) จุลินทรีย์ (microorganism) ที่บุกรุก เป็นต้น ระบบอิมมูนแบบสารน้ำ (humoral immunity) ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด รวมทั้งโปรตีนจดจำรูปแบบ (pattern recognition proteins, PRPs) (Medzhitov and Janeway, 1997) โปรตีนบางชนิดยังไม่มีการศึกษาเนื่องจากในสภาวะปกติจะมีปริมาณน้อยมากและถูกสังเคราะห์หรือหลั่งออกมามากขึ้นเมื่อสัตว์มีการติดเชื้อหรือถูกกระตุ้น โปรตีนเหล่านี้สัมพันธ์กับจุลินทรีย์ที่บุกรุก โดยจดจำและจับกับโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นคาร์โบไฮเดรต เช่น peptidoglycan เบตา-

1,3-กลูแคน (β-1,3-glucan) หรือ lipopolysaccharide (LPS) PRPs ที่จับกับ LPS หรือเบตา-1,3-กลูแคนในครัสเตเชียนเรียก LPS-binding protein (LBP) และ β-1,3-glucan-binding protein (BGBP) ส่วนโปรตีนที่จับได้ทั้ง LPS และเบตา-1,3-กลูแคน เรียก LGBP (LPS- and β-1,3-glucan-binding protein) (Duvic and Söderhäll, 1990; Lee *et al.*, 2,000) PRPs เหล่านี้ถูกกระตุ้นได้โดยคาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์จุลินทรีย์ เช่นเบตา-1,3-กลูแคนหรือ LPS และมีบทบาทเกี่ยวข้องในระบบป้องกันตนเองทั้งในสัตว์มีและไม่มีกระดูกสันหลัง โดยจับกับคาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์จุลินทรีย์บุกรุก แล้วไปจับกับตัวรับบนเมมเบรน (membrane receptor) ของเซลล์ฮีโมไซท์ที่มีกรานูล (semigranular cell) (Davic and Söderhäll, 1990) แล้วชักนำให้เกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ ตามมา เช่นกระตุ้นให้เซลล์ฮีโมไซท์กำจัดสิ่งแปลกปลอม โดยมีอัตราการเกิดการกลืนกินเร็วขึ้น (Thornqvist *et al.*, 1994) หรือ มีการสลายกรานูลของเซลล์ฮีโมไซท์ในกุ้งนาง (crayfish *Pacifastacus leniusculus*) (Barracco *et al.*, 1991) นำไปสู่การหลั่งเอนไซม์ prophenoloxidase activating enzyme ซึ่งไปกระตุ้นระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase system) ให้สร้างเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase) (Aspan and Söderhäll, 1991; Johansson *et al.*, 1995; Sritunyalucksana *et al.*, 2001) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในวิถีการสังเคราะห์เมลานิน (melanin) ทั้งเมลานินและสารตัวกลางในวิธีการสร้างเมลานินมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่บุกรุกต่อไป (Söderhäll and Cerenius, 1998) นอกจากนี้ การสลายของเซลล์ฮีโมไซท์ชนิดมีกรานูลยังมีการหลั่งสารชนิดอื่น ๆ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการเจริญของจุลินทรีย์บุกรุก เช่นตัวยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนส (proteinase inhibitor) (Söderhäll and Cerenius, 1992) เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีเนสของจุลินทรีย์ในการย่อยโปรตีนที่แข็งตัว (clotting protein) ของเซลล์เจ้าบ้าน หรือมีการหลั่งเลคติน (lectin) ซึ่งเป็น PRP ชนิดหนึ่งที่จับจำเพาะกับน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรทบนผนังเซลล์จุลินทรีย์เพื่อช่วยกำจัดการบุกรุกของจุลินทรีย์ จากการที่ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์มีโครงสร้างของน้ำตาลที่ซับซ้อนและหลากหลาย จึงมีเลคตินหลายชนิดในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน โดยแบ่งตามความจำเพาะต่อชนิดของคาร์โบไฮเดรต เนื่องจากเลคตินสามารถทำให้เซลล์จุลินทรีย์เกิดการเกาะกลุ่ม (agglutinate) ได้ จึงเป็นการยับยั้งไม่ให้จุลินทรีย์แพร่กระจายไปยังที่ต่าง ๆ นอกจากนี้เลคตินยังจับระหว่างจุลินทรีย์และเซลล์ฮีโมไซท์นำไปสู่การกลืนกินจุลินทรีย์ที่บุกรุกได้ (Sritunyalucksana *et al.*, 2001) แม้เลคตินไม่ได้เป็นตัวทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคโดยตรง แต่พบว่าเลคตินสามารถจับกับโปรตีน BGBP ได้ในกุ้งนาง (Duvic and Söderhäll, 1990) หรือในกุ้ง *Penaeus californiensis* (Vargas-Albores *et al.*, 1996) และทำให้ BGBP ไปกระตุ้นกลไกการป้องกันตนเองให้เกิดการตอบสนองของเจ้าบ้านต่อจุลินทรีย์บุกรุกต่อไป

ปัจจุบันยังมีรายงานการศึกษาโปรตีน LGBP ในกุ้งน้อยมาก มีการศึกษาทั้งระดับโปรตีนและยีนในกุ้งนาง พบว่า LGBP ของกุ้งนางมีขนาดเล็กกว่า BGBP คือมีมวลโมเลกุล 40 kDa ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์สายเดียว ไม่มีหน่วยย่อย สามารถจับได้ทั้ง LPS และเบตา-1,3-กลูแคน การกระตุ้นแอคทิวิที (activity) ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสถูกยับยั้งได้โดยแอนติบอดีต่อ LGBP บริสุทธิ์ (Lee *et*

al., 2000) มีการศึกษายีน LGBP โดยไม่มีการศึกษาระดับโมเลกุลโปรตีนในกุ้งขาวจีน (Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*) (Du *et al.*, 2007) และกุ้งขาว (Cheng *et al.*, 2005) มีรายงานการแสดงออกของยีน LGBP เพิ่มขึ้นหลังการฉีดกุ้งขาวด้วยแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* (Cheng *et al.*, 2005) หรือการฉีดด้วยไวรัส WSSV ในกุ้ง *Penaeus stylirostris* (Roux *et al.*, 2002) แสดงให้เห็นถึงบทบาทที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของ LGBP ในกุ้ง เนื่องจากข้อมูลด้านโปรตีนและยีนของ LGBP ของกุ้งพีเนียด (penaeid) ยังมีไม่มากนัก ซึ่งโปรตีนนี้เป็น PRP ที่สามารถจับได้ทั้ง LPS และเบตา-1,3-กลูแคนของจุลินทรีย์ก่อโรค อันจะนำไปสู่การกระตุ้นระบบภูมิคุ้นกันในกุ้งได้ดี งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะใช้กุ้งขาวซึ่งเป็นกุ้งเศรษฐกิจเป็นกุ้งตัวอย่างในการศึกษา โดยมีจุดประสงค์ที่จะศึกษาโมเลกุลระดับโปรตีนและยีนของ LGBP ด้วยการทำให้โปรตีน LGBP บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของ LGBP รวมทั้งโคลนและศึกษาคุณสมบัติของยีน LGBP ตลอดจนศึกษาผลของการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อก่อโรคกุ้งต่อการแสดงออกของยีน LGBP ในกุ้งขาว แม้ความรู้ที่ได้ในเบื้องต้นนี้ยังไม่สามารถนำไปแก้ปัญหาการติดโรคกุ้งโดยตรงได้ แต่ทำให้เข้าใจถึงบทบาททางชีวภาพของ LGBP ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของกุ้งขาวเมื่อถูกกระตุ้นให้ติดเชื้อก่อโรค ซึ่งจะเป็นข้อมูลวิจัยส่วนหนึ่งนำไปสู่การเรียนรู้กลไกการป้องกันตนเองในกุ้ง โดยนำไปเชื่อมโยงกับบทบาทการทำงานของเลคตินและกับโปรตีนชนิดอื่น ๆ เช่นเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ซึ่งผู้วิจัยได้ศึกษาในกุ้งแชบ๊วย (*Fenneropenaeus merguiensis*) ไปก่อนแล้ว ทั้งนี้จากการที่พบว่าโปรตีนต่าง ๆ ในสิ่งมีชีวิตมักไม่ทำงานเดี่ยว ๆ แต่มีการทำงานร่วมหรือเชื่อมโยงกัน นอกจากนี้ ผลการวิจัยที่ได้คาดว่าจะเป็นประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้กับการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อทำให้โปรตีนจับลิโพโพลีแซคคาไรด์และเบตา-1,3-กลูแคน (LGBP) บริสุทธิ์จากกุ้งขาว
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของ LGBP
3. เพื่อสร้าง cDNA สายเต็มของยีน LGBP ของกุ้งขาว
4. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน LGBP ในเนื้อเยื่อของกุ้งขาว
5. เพื่อศึกษาผลการเหนี่ยวนำเชื้อก่อโรคกุ้งต่อการแสดงออกของยีน LGBP ในกุ้งขาว

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่าง

กุ้งขาวที่ใช้ศึกษาเป็นกุ้งมีชีวิต น้ำหนักประมาณตัวละ 10-15 กรัม อยู่ในระยะคราบแข็ง ซื้อจากฟาร์มเลี้ยงในจังหวัดสงขลาหรือจังหวัดใกล้เคียงอื่น ๆ

1.1 การเตรียมซีรัมหรือฮีโมลิมฟ์

ดูดเลือดจากกุ้งขาวด้วยกระบอกฉีดยา ปล่อยให้เลือดแข็งตัว ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 1 คืน แล้วโฮโมจีไนซ์ (homogenize) จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) ที่ความเร็ว 500 x g ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใสหรือฮีโมลิมฟ์ที่เตรียมได้ ที่ -20 °ซ เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

1.2 การเตรียมเซลล์ฮีโมไซท์

ดูดเลือดจากกุ้งขาว ผสมกับสารกันเลือดแข็งตัว [450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM EDTA (ethylinediamine tetraacetic acid), 10 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) และ 10 mM HEPES, pH 7.3] ทันทีให้มีอัตราส่วนเป็น 1:1 นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 800 x g ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 20 นาที ล้างตะกอนฮีโมไซท์ที่ได้โดยการแขวนลอยใน 10 mM sodium cacodylate, 0.45 M NaCl, 20 mM $CaCl_2$, pH 7 แล้วเซนตริฟิวจ์อีกครั้ง เก็บตะกอนฮีโมไซท์ที่ -80 °ซ เพื่อใช้เตรียม Total RNA หรือนำไปเตรียมสารสกัดฮีโมไซท์ ซึ่งทำโดยการโฮโมจีไนซ์เซลล์ฮีโมไซท์ในบัฟเฟอร์ 10 mM sodium cacodylate, 100 mM $CaCl_2$, pH 6.5 นำส่วนใส (hemocyte lysate, HLS) ที่ได้หลังการเซนตริฟิวจ์ที่ 9,300 x g นาน 5 นาที ไปศึกษา LGBP ต่อทันที

1.3 การเตรียมสารสกัดตับ

หลังการดูดเลือดเรียบร้อยแล้ว ตัดตับจากกุ้งขาวและเก็บที่อุณหภูมิ -80 °ซ จนกว่าจะใช้ ในการเตรียมสารสกัดตับ ทำโดยตัดตับเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วโฮโมจีไนซ์ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 - 1 mM PMSF จากนั้นเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 16,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 10 นาที ส่วนใสที่ได้เป็นสารสกัดตับนำไปทำให้โปรตีน LGBP บริสุทธิ์หรือศึกษาคุณสมบัติต่อไป

หาปริมาณโปรตีนของแต่ละตัวอย่างด้วยวิธี Bradford (1976) โดยใช้ BSA (bovine serum albumin) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

2. การตรวจหาโปรตีน LGBP ในเนื้อเยื่อโดยวิธี Western blot

เพื่อตรวจหาว่าโปรตีน LGBP กระจายอยู่ในเนื้อเยื่อใดของกุ้งขาว นำฮีโมลิมฟ์ สารสกัดฮีโมไซท์ และสารสกัดตับไปวิเคราะห์ด้วยการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส ที่มีความเข้มข้นเจล 12% (12% SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) (Laemmli, 1970) แล้ววิเคราะห์ต่อด้วยวิธี Western blot ตามวิธีของ Auttarat และคณะ (2006; Towbin *et al.*, 1979) ดังนี้ ขนถ่ายโปรตีนในแผ่นเจลลงบนแผ่นไนโทรเซลลูโลสเมมเบรน (nitrocellulose membrane) ทำใน 0.025 M Tris, 0.192 M glycine, 10% methanol, pH 8.3 และใช้กระแสไฟฟ้าที่ 500 mA นาน 1 ชั่วโมง ล้างเมมเบรนด้วย TBS (50 mM Tris-HC, pH 7.5 - 0.9% NaCl) จากนั้นนำไปบ่มใน TBS ที่มี 10% skim milk ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 ชั่วโมง แล้วล้างเมมเบรน 3 ครั้ง ด้วย TBS ที่มี 0.05% Tween 20 (TBST) นำไปบ่มต่อด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีนลูกผสม LGBP

บริสุทธิ์ของกุ้งแชบ๊วย (anti - FmrLGBP, 1°Ab) (ได้จากงานวิทยานิพนธ์ปริญญาเอกของนางสาวอารีรัตน์ เชาว์สมบูรณ์) ใน TBST ที่มี 5% skim milk ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง ล้างเมมเบรนด้วย TBST 3 ครั้ง นำไปบ่มต่อในสารละลายแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายซึ่งยึดอยู่กับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสหรือ 2°Ab (goat anti-rabbit IgG peroxidase conjugated) ที่เจือจาง 1:20,000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย TBST 3 ครั้ง และล้างต่อด้วย TBS 2 ครั้ง จากนั้นย้อมเมมเบรนด้วย TMB (3,3′,5,5′-tetramethylbenzidine) substrate kit และหยุดปฏิกิริยาโดยการล้างเมมเบรนด้วยน้ำกลั่น

3. การทำให้ LGBP บริสุทธิ์

จากผลวิจัยข้อ 2 พบแถบโปรตีน LGBP เฉพาะในสารสกัดตับของกุ้งขาว งานวิจัยนี้จึงได้ทำบริสุทธิ์ LGBP จากสารสกัดตับของกุ้งขาว โดยคอลัมน์ Q-Sepharose และด้วยการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม (Preparative PAGE) ดังนี้ เตรียมคอลัมน์ Q-Sepharose ที่มีปริมาตรเจล 25 มิลลิลิตร ปรับสมดุลคอลัมน์ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ที่มี 1 mM PMSF นำสารกสัดตับ (จากข้อ 1.3) (234 มิลลิกรัม) ผ่านลงในคอลัมน์ Q-Sepharose แล้วล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิมปริมาตร 40 มิลลิลิตร เก็บสารละลายหลอดละ 0.8 มิลลิลิตร วัดปริมาณโปรตีน จนมีปริมาณโปรตีนเข้าใกล้ศูนย์ แล้วชะคอลัมน์ด้วย 0.5 M NaCl ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ที่มี 1 mM PMSF ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ตามด้วย 1 M NaCl ในบัฟเฟอร์ชนิดเดิมปริมาตร 20 มิลลิลิตร รวมสารละลายหลอดที่มีปริมาณโปรตีนสูง ทำให้เข้มข้นและไดอะไลซ์ (dialyze) ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 และทดสอบความบริสุทธิ์โดยการทำ 12% SDS-PAGE แล้วนำสารละลายโปรตีนพีค (peak) 3 ที่ได้จากคอลัมน์ Q-Sepharose ไปแยกต่อด้วยการทำ Preparative PAGE ตามวิธีของ Auttarat และคณะ (2006) โดยการแยกสารละลาย LGBP เข้มข้นด้วยการทำ PAGE แบบไม่แปลงสภาพ (Native PAGE) (Davis, 1964) ในเจลทั้งแผ่นที่มีความเข้มข้นของเจล 12% หลังทำอิเล็กโทรฟอรีซิส ตัดเจลเฉพาะแถบโปรตีน LGBP ตามขวางตลอดแผ่น ชะโปรตีน LGBP ออกจากชิ้นเจลด้วยการโฮโมจีไนซ์ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 แล้วเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 16,000 x g ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปไดอะไลซ์ในบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ทำให้เข้มข้น หาปริมาณโปรตีน ทดสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีน LGBP โดยวิธี SDS-PAGE

4. การศึกษาคุณสมบัติของโปรตีน LGBP บริสุทธิ์

4.1 การหามวลโมเลกุลของ LGBP บริสุทธิ์

หามวลโมเลกุลและจำนวนหน่วยย่อยของ LGBP บริสุทธิ์โดยวิธี SDS-PAGE ที่มีความเข้มข้นของเจล 6-12% และในสภาพรีดิวซ์ (reduce) หรือไมรีดิวซ์ หลังการทำอิเล็กโทรฟอรีซิส ย้อมโปรตีนในเจลด้วยสีคูมาซีบลู (0.02% Coomassie blue R-250, 50% methanol, 7.5% acetic acid) แล้วคำนวณมวลโมเลกุลของ LGBP เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทำการทดลองควบคู่กัน

4.2 การทดสอบการกระตุ้นเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสโดย LGBP บริสุทธิ์

เพื่อทดสอบว่า LGBP บริสุทธิ์สามารถกระตุ้นแอคทิวิทีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสได้หรือไม่ ทำโดยการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในสารสกัดฮีโมไซท์ (จากข้อ 1.2) โดยใช้ L-DOPA (3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine) เป็นสับสเตรท ตามวิธีการของวิไลพร ธรรมรัตน์ (2551) ในสภาวะที่มี LGBP บริสุทธิ์ และมีหรือไม่มีเบตา-1,3-กลูแคนหรือลามินาริน (laminarin), lipopolysaccharide (LPS) หรือ lipoteichoic acid (LTA) ดังนี้ ใช้สารสกัดฮีโมไซท์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (ปริมาณโปรตีน 100 ไมโครกรัม) ผสมกับ LGBP บริสุทธิ์ ปริมาณ 2 ไมโครกรัม ในสภาวะที่ไม่มีหรือมีเบตา-1,3-กลูแคน ปริมาณ 5 ไมโครกรัม ในบัฟเฟอร์ CAC (10 mM sodium cacodylate, pH 8) ให้มีปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตร บ่มสารผสมที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นเติม 4 mg/ml L-DOPA ปริมาตร 90 ไมโครลิตร และบัฟเฟอร์ CAC ให้มีปริมาตรรวม 320 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 45 วินาที แล้วปรับให้มีปริมาตรครบ 0.8 มิลลิลิตร ด้วยบัฟเฟอร์ CAC, pH 8 จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร (A490) ทุกนาที นาน 5 นาที กำหนดให้ค่าแอคทิวิทีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส 1 หน่วย เท่ากับค่า A490 ที่เปลี่ยนไป 0.001 หน่วย ในเวลา 1 นาที แล้ววิเคราะห์โดยเปรียบเทียบแอคทิวิทีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในสภาวะที่มีกับสภาวะที่ไม่มีเบตา-1,3-กลูแคน

เพื่อศึกษาผลของ LPS หรือ LPA ทำการทดลองในทำนองเดียวกัน แต่ใช้ LPS หรือ LTA อย่างละ 5 ไมโครกรัม แทนเบตา-1,3-กลูแคน ในการบ่มกับ LGBP บริสุทธิ์

4.3 การทดสอบการเกาะกลุ่มแบคทีเรียโดย LGBP บริสุทธิ์

ทดสอบการเกาะกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรคกุ้ง ได้แก่ *Vibrio parahaemolyticus* (เลี้ยงตามวิธีการข้อ 7.1) ทำโดยใช้โปรตีน LGBP บริสุทธิ์ ดูการเหนี่ยวนำให้แบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* เกิดการเกาะกลุ่ม ตามวิธีของ Utarabhand และคณะ (2007) ดังนี้ เจือจางโปรตีน LGBP บริสุทธิ์ ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมใน TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.5 -0.9% NaCl) ที่มี 10 mM $CaCl_2$ จากนั้นใช้ LGBP ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับสารแขวนลอยแบคทีเรียปริมาตร 50 ไมโครลิตร ($5x10^7$ เซลล์) วางที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง พร้อมเขย่า 1-2 ครั้ง จากนั้นหยดสารผสมลงบนสไลด์ ปิดด้วย cover slid แล้วสังเกตการเกาะกลุ่มแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ ในการทดลองนี้ใช้โปรตีน BSA เป็นชุดควบคุม ในการทดสอบผลของความต้องการ $CaCl_2$ ในการเกาะกลุ่ม *V. parahaemolyticus* ด้วย LGBP บริสุทธิ์ ทำในสภาวะที่มี 10 mM EDTA แทน 10 mM $CaCl_2$ แล้วทดลองต่อในทำนองเดียวกัน

นอกจากนี้ได้ทดสอบผลการยับยั้งการเกาะกลุ่ม *V. parahaemolyticus* โดยโปรตีน LGBP บริสุทธิ์ ด้วยน้ำตาลทำโดยเจือจางเบตา-1,3-กลูแคน หรือ LPS ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน แล้วผสม LGBP บริสุทธิ์ที่มีความเข้มข้นเหมาะสม ปริมาตร 25 ไมโครลิตร กับน้ำตาลแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร วางที่อุณหภูมิห้อง นาน 45 นาที จากนั้นเติมสารแขวนลอยแบคทีเรียปริมาตร 50 ไมโครลิตร ($5x10^7$ เซลล์) ตั้งที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง พร้อมเขย่า 1-2 ครั้ง แล้วดูการ

เกาะกลุ่มเซลล์แบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นคำนวณความเข้มข้นต่ำสุดของเบตา-1,3-กลูแคน หรือ LPS ที่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของ *V. parahaemolyticus* ได้อย่างสมบูรณ์

4.4 การทดสอบการจับระหว่าง LGBP บริสุทธิ์กับแบคทีเรีย

เพื่อทดสอบการจับของ LGBP บริสุทธิ์กับแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง ทำการทดลองโดยนำ LGBP บริสุทธิ์ ปริมาณ 10 ไมโครกรัม บ่มกับแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ($5x10^7$ เซลล์) ในบัฟเฟอร์ TBS ปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร ในสภาวะที่มีหรือไม่มี 10 mM $CaCl_2$ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 6,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิม รวม 3 ครั้ง แล้วชะ LGBP ออกจากตะกอนเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ที่มี 7% SDS จากนั้นนำส่วนใสที่ได้จากการเซนตริฟิวจ์ไปวิเคราะห์ด้วยการทำ 12% SDS-PAGE และ Western blot ตามวิธีการข้อ 2

5. การโคลนยีน LGBP

5.1 การสร้างไพรเมอร์และการเตรียม RNA จากตับของกุ้งขาว

จากข้อมูล conserved nucleotide sequence ของยีน LGBP ของกุ้งชนิดอื่น ๆ ที่หาได้จากฐานข้อมูลใน GenBank นำข้อมูลเหล่านี้ไปออกแบบสร้าง forward และ reverse primer (รูปที่ 8) และนำไพรเมอร์เหล่านี้ไปใช้ในการสร้าง cDNA ของยีน LGBP โดยเตรียม RNA ด้วยการสกัด total RNA จากตับของกุ้งขาว โดยใช้ชุดเตรียม RNA และทำตามวิธีการของบริษัท (Qiagen) ตรวจความบริสุทธิ์ของ RNA เทียบกับปริมาณโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 และ 260 นาโนเมตร

เนื่องจากผลงานวิจัยนี้ยังไม่ได้เตรียมต้นฉบับเพื่อตีพิมพ์เผยแพร่ จึงขอไม่ระบุลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ทั้งหมดและรายละเอียดของการโคลนยีนไว้ในรายงานฉบับนี้

5.2 การสร้าง cDNA ชิ้นกลางของยีน LGBP และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

สร้าง cDNA จาก total RNA ที่สกัดจากตับ โดยวิธี RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) โดยใช้เอนไซม์ Reverse Transcriptase (RT) และใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากข้อ 5.1 (LGBP-F1 และ LGBP-R1, รูปที่ 8) เพิ่มปริมาณ cDNA ของยีน LGBP ด้วยการทำ polymerase chain reaction (PCR) ภายใต้สภาวะดังนี้ บ่มที่ 94 °ซ นาน 2 นาที ตามด้วยการทำ denaturation 35 รอบ ที่ 94 °ซ นาน 30 วินาที, annealing ที่ 58 °ซ นาน 45 วินาที และ extension ที่ 72 °ซ นาน 1 นาที จากนั้นทำ final extension ที่ 72 °ซ 5 นาที วิเคราะห์ PCR product ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ใน 40 mM Tris-acetate, pH 8 - 1 mM EDTA ใช้กระแส 50 V นาน 45 นาที แล้วย้อมเจลด้วย ethidium bromide สกัดชิ้น PCR cDNA ออกจากเจลโดยใช้ Gel extraction kit จากนั้นโคลนเข้าสู่ pGEM-T Easy vector (Promega) ด้วย PCR cloning kit แล้ว transform เข้า competent cell ของ *E. coli* DH5α ตรวจสอบชิ้น cDNA ด้วย *Eco*RI และส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์

โดยใช้ T7-SP6 primer, internal primer และ Dye terminator cycle sequencing kit ด้วยเครื่อง Automate DNA Sequencer (Applied Biosystems)

5.3 การสร้าง cDNA สายเต็ม (Full-length cDNA) ของยีน LGBP

สร้างชิ้น cDNA ที่ปลาย 5' และ 3' ของยีน LGBP ด้วยเทคนิค 5' และ 3' RACE (rapid amplification of cDNA end) (Rattanaporn and Utarabhand, 2011) โดยใช้ GeneRacer kit (Invitrogen) ซึ่งสร้าง cDNA สายแรกด้วย GeneRacer SuperScript II RT และใช้ oligo dT primer แล้วทำ PCR ด้วย *Taq* DNA polymerase โดยใช้ LGBP-F1 และ GeneRacer3' primer (รูปที่ 8) สำหรับ 3' RACE และปฏิกิริยา PCR สำหรับ 3' และ 3' nested RACE ประกอบด้วยการบ่มที่ 94 °ซ 2 นาที แล้วบ่มจำนวน 5 รอบ ที่ 94 °ซ 30 วินาที และ 72 °ซ 2 นาที ตามด้วย 5 รอบ ที่ 94 °ซ 30 วินาที, 70 °ซ 30 วินาที และ 72 °ซ 1.5 นาที จากนั้นตามด้วย 25 รอบ ที่ 94 °ซ 30 วินาที, 68 °ซ 30 วินาที และ 72 °ซ 1.5 นาที แล้วบ่มรอบสุดท้ายที่ 72 °ซ 5 นาที ขณะที่ใช้ LGBP-R1 (รูปที่ 8) และ GeneRacer5' primer สำหรับ 5' RACE โดยทำ PCR สำหรับ 5' และ 5' nested RACE สภาวะเดียวกับวิธีการข้อ 5.2 วิเคราะห์ PCR product และส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ตามวิธีข้อ 5.2 จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA สามชิ้นมาเหลื่อมกันเพื่อสร้างเป็น cDNA สายเต็มของยีน LGBP นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA สายเต็มของยีน LGBP ของกุ้งขาวที่หาได้ไปเปรียบเทียบกับยีน LGBP ของกุ้งชนิดอื่นที่มีอยู่ใน GenBank เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนของยีนนี้กับยีนของกุ้งชนิดอื่น ๆ

6. การศึกษาการแสดงออกของยีน LGBP ในเนื้อเยื่อของกุ้ง

เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน LGBP ในเซลล์ฮีโมไซท์ ตับและเนื้อเยื่ออื่น ๆ ของกุ้งขาว สกัด total RNA จากเนื้อเยื่อเหล่านี้ของกุ้งด้วยชุดเตรียม RNA และทำตามวิธีการของบริษัท (Qiagen) จากนั้นใช้ RNA และไพร์เมอร์คู่ที่ใช้ในวิธีการข้อ 5.2 ติดตามการแสดงออกของ mRNA ของยีน LGBP ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ โดยวิธี RT- PCR ตามวิธีการข้อ 5.2 และใช้ 18S rRNA เป็น internal standard

7. การทดสอบการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อก่อโรคที่มีผลต่อการแสดงออกของยีน LGBP ในกุ้งขาว

7.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียและไวรัส

หัวเชื้อ (stock) ของไวรัส WSSV และแบคทีเรีย *V. harveyi* ที่ใช้ในการทดลองได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เก็บจุลินทรีย์ไว้ที่ -80 °ซ จนกว่าจะใช้

ในการเตรียมแบคทีเรีย ทำโดยเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารแข็ง TSA (tryptic soy agar) ที่มี 1.5% NaCl ที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 18 ชั่วโมง เพิ่มปริมาณเชื้อโดยนำเชื้อ 1 โคโลนี ไปเลี้ยงในอาหารเหลว TSB

(tryptic soy broth) ที่มี 1.5% NaCl ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นาน 18 ชั่วโมง ที่ 37 °ซ จากนั้นเจือจาง 1:100 แล้วเลี้ยงต่อในอาหารเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 18 ชั่วโมง นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 1,100 x g นาน 30 นาที ที่ 4 °ซ จากนั้นล้างเซลล์ในน้ำเกลือ (0.85% NaCl) นำไปเซนตริฟิวจ์ ล้างตะกอนและเตรียมแบคทีเรียในน้ำเกลือให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.5-0.9 หน่วย นับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี plate count agar แล้วเก็บที่ 4 °ซ เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

7.2 **การศึกษาการแสดงออกของยีน LGBP ในตับที่บ่มด้วยจุลินทรีย์ก่อโรค**

เพื่อศึกษาการตอบสนองของยีน LGBP ต่อจุลินทรีย์ก่อโรคกุ้ง ทำโดยตัดตับออกจากตัวกุ้งขาว ตับของกุ้งแต่ละตัวตัดแยกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ชิ้นละประมาณ 30 มิลลิกรัม นำไปวางใน culture plate ที่มี K-199 culture medium แล้วเติม *V. harveyi* หรือ *V. parahaemolyticus* หลุมละ $5x10^7$ เซลล์ หรือ WSSV (10^{-7} stock) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 0 - 4 ชั่วโมง แล้วนำชิ้นตับที่เวลาต่าง ๆ ไปสกัด total RNA จากนั้นติดตามการแสดงออกของ mRNA ของยีน LGBP โดยวิธี RT- PCR เชิงปริมาณ (semi-quantitative RT- PCR) เทียบกับชุดควบคุมที่บ่มกับ K-199 อย่างเดียว

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. **การตรวจหาโปรตีน LGBP ในเนื้อเยื่อของกุ้งขาวโดยวิธี Western blot**

เนื่องจากโปรตีน LGBP ไม่มีแอคทิวิทีทางชีวภาพที่ตรวจวัดได้ง่าย และยังไม่มีโปรตีน LGBP ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในกุ้งขาวมาก่อน งานวิจัยนี้ต้องการติดตามโปรตีน LGBP ในขั้นตอนของการทำบริสุทธิ์ จึงทดสอบการทำปฏิกิริยาระหว่างโปรตีน LGBP ของกุ้งขาวกับแอนติบอดีต่อโปรตีนลูกผสม FmrLGBP ของกุ้งแชบ๊วย (*F. merguiensis* recombinant LGBP) ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการของรองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทารพันธุ์ (อารีรัตน์ เชาว์สมบูรณ์ และคณะ, 2556) พบว่ามีโปรตีนหนึ่งแถบในสารสกัดตับจากกุ้งขาว ซึ่งมีมวลโมเลกุลประมาณ 40 kDa (รูปที่ 1A แถวที่ 3) ที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดีดังกล่าวได้เป็นอย่างดี (รูปที่ 1B แถวที่ 3) เมื่อเทียบกับการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน (FmrLGBP ของกุ้งแชบ๊วย) กับแอนติบอดีต่อ FmrLGBP ของกุ้งแชบ๊วยเอง (รูปที่ 1 แถวที่ 2) นอกจากนี้ แอนติบอดีต่อ FmrLGBP ของกุ้งแชบ๊วยยังมีความจำเพาะกับโปรตีน (40 kDa) ดังกล่าวในสารสกัดตับจากกุ้งขาว เพราะเกิดปฏิกิริยาได้กับเฉพาะโปรตีน 40 kDa เท่านั้น โดยไม่พบการเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนแถบอื่น ๆ ในสารสกัดตับ หรือกับโปรตีนมาตรฐานทุกชนิด (รูปที่ 1 แถวที่ 1) นอกจากนี้ จากการโคลนยีน LGBP จากกุ้งขาว พบว่ายีน LGBP สามารถแปลเป็นเปปไทด์ที่มีขนาด 41.6 kDa และมีการแสดงออกมากที่สุดในตับ ไม่พบในเซลล์ฮีโมไซท์ บ่งชี้ว่าแถบโปรตีน (40 kDa) เพียงแถบเดียวในสารสกัดตับที่เกิดปฏิกิริยากับแอนตีบอดีต่อ FmrLGBP ของกุ้งแชบ๊วย (รูปที่ 1B แถวที่ 3) เป็นโปรตีน LGBP

เพราะพบในตับและมีมวลโมเลกุลใกล้เคียงกับโปรตีน LGBP ที่คำนวณได้จากยีน LGBP ของ กุ้งขาว

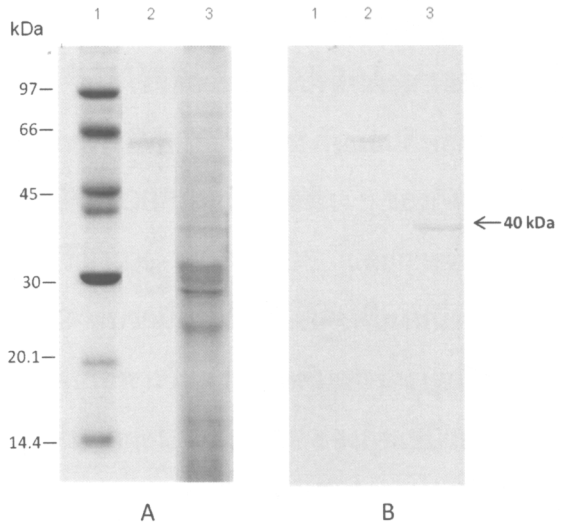

Fig. 1 Electrophoretic protein pattern of LGBP. Proteins were separated by 12% SDS-PAGE and stained with Coomassie blue (A). LGBP was analyzed by Western blotting and stained with anti-FmrLGBP antibody (B). Lane 1, molecular weight markers; lane 2, FmrLGBP and lane 3, hepatopancreas extract.

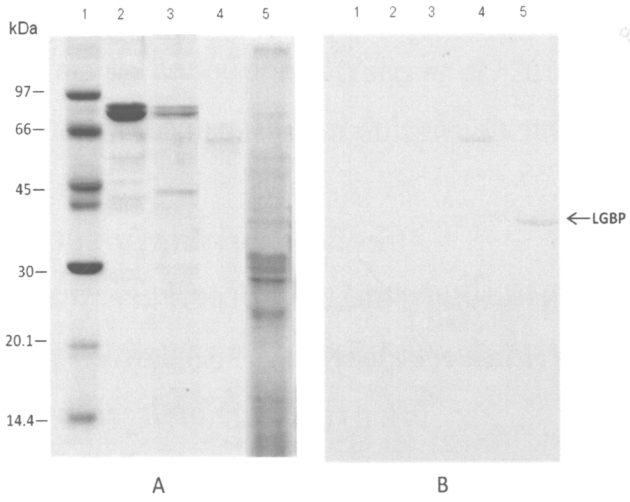

Fig. 2 Protein pattern in 12% SDS-PAGE (A) and Western blotting (B). The gel was stained with Coomassie blue (A) and LGBP was detected with anti-FmrLGBP antibody (B). Lane 1, molecular weight markers; lane 2, hemolymph; lane 3, hemocyte lysate; lane 4, FmrLGBP and lane 5, hepatopancreas extract.

LGBP เป็นหนึ่งในโปรตีนที่มีความสำคัญในระบบภูมิกันแบบอาศัยสารน้ำ ทำหน้าที่เป็นโปรตีนจดจำรูปแบบ (PRP) มีรายงานว่าโปรตีน LGBP ถูกสังเคราะห์ในฮีโมไซท์ แต่มีการแสดงออกของ LGBP ในเนื้อเยื่ออื่น ๆ นอกเหนือจากฮีโมไซท์ อาทิเช่น พบการแสดงออกของยีน LGBP ในตับของกุ้งแชบ๊วย (Rattanaporn, 2010) และกุ้ง *L. stylirostris* (Roux *et al.*, 2002)

จากผลการทดลองข้างต้น จึงได้ใช้วิธีการแยกโปรตีนด้วย 12% SDS-PAGE และติดตามแถบโปรตีน LGBP ของกุ้งขาวด้วยการทำ Western blot กับแอนติบอดีต่อ FmrLGBP ของกุ้งแชบ๊วย เพื่อตรวจหาการกระจายตัวของโปรตีน LGBP ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งขาว โดยใช้โปรตีนตัวอย่าง อย่างละ 60 ไมโครกรัม นำไปแยกด้วยวิธี 12% SDS-PAGE และการทำ Western blot กับแอนติบอดีต่อ FmrLGBP ดังแสดงผลในรูปที่ 2 พบว่ามีโปรตีน LGBP เพียงหนึ่งแถบที่เกิดปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับแอนติบอดีต่อ FmrLGBP โดยพบเฉพาะในสารสกัดตับเท่านั้น (รูปที่ 2B แถวที่ 5) ซึ่งเกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดีได้ดีเช่นเดียวกับโปรตีนลูกผสม FmrLGBP ของกุ้งแชบ๊วย (รูปที่ 2B แถวที่ 4) และไม่พบว่ามีโปรตีนแถบใด ๆ ในฮีโมลิมฟ์ (รูปที่ 2B แถวที่ 2) หรือในสารสกัดฮีโมไซท์ (รูปที่ 2B แถวที่ 3) ที่เกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดีนี้ บ่งชี้ว่าโปรตีน LGBP พบเฉพาะในตับของกุ้งขาว โดยไม่พบในฮีโมลิมฟ์หรือในสารสกัดฮีโมไซท์ ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกของยีน LGBP ของกุ้งขาวที่มีการแสดงออกมากที่สุดในตับ และไม่พบในเซลล์ฮีโมไซท์ จากการที่พบโปรตีน LGBP เฉพาะในตับของกุ้งขาว ผลที่ได้แตกต่างจากการกระจายตัวของโปรตีนลูกผสม LGBP จากกุ้งขาวจีน (*F. chinensis*) ที่วิเคราะห์ด้วยการทำอิมมูโนพยาธิวิทยา (immunohistochemistry) ซึ่งพบว่ามีการกระจายตัวอยู่มากบนเมมเบรนของเซลล์ฮีโมไซท์ (Du *et al.*, 2006) เช่นเดียวกับการศึกษาโปรตีนลูกผสม LGBP ของหอยเชลล์ด้วยวิธี immunofluorescence ที่พบว่ามีการกระจายตัวอยู่มากบนเมนเบรนของฮีโมไซท์และยังพบการกระจายตัวของโปรตีน LGBP ใน mantle และเหงือกด้วย (Yang *et al.*, 2010) อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาการกระจายตัวของโปรตีน LGBP ในเนื้อเยื่อของกุ้งในระดับโปรตีนไม่มากนัก

2. การทำให้โปรตีน LGBP บริสุทธิ์จากสารสกัดตับ

จากผลการศึกษาการกระจายตัวของโปรตีน LGBP ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งขาวด้วยวิธี Western blot พบการกระจายตัวของโปรตีน LGBP ในตับของกุ้งขาว ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกทำบริสุทธิ์โปรตีน LGBP จากสารสกัดตับจากกุ้งขาวโดยมีขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

2.1 การแยกโดยคอลัมน์ Q-Sepharose

จากการนำสารสกัดตับที่เตรียมได้จากวิธีการข้อ 1.3 (ปริมาณโปรตีน 234 มิลลิกรัม) ไปแยกด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุลบแบบ Q-Sepharose (ปริมาตรเจล 25 มิลลิลิตร) ที่ปรับให้สมดุลก่อนด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ที่มี 1 mM PMSF ปริมาตร 4 เท่า ของปริมาตรคอลัมน์ จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิม จนมีปริมาณโปรตีนเข้าใกล้ศูนย์ พบโปรตีนอื่นที่ไม่จับกับคอลัมน์ถูกล้างออกมาใน 2 พีค (peak) คือพีค Q1 และพีค Q2 (รูปที่ 3) เมื่อวัดโปรตีนที่ชะออกมา พบว่าพีค Q1 มี

ปริมาณโปรตีน 17.52 มิลลิกรัม และพีค Q2 มีโปรตีน 4.04 มิลลิกรัม ซึ่งคิดเป็น 7.5% และ 1.7% ของโปรตีนรวมในสารสกัดตับเริ่มต้น ตามลำดับ (ตารางที่ 1) และเมื่อชะคอลัมน์ต่อด้วย 0.5 M NaCl ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ที่มี 1 mM PMSF พบโปรตีนถูกชะออกมา 1 พีค คือ พีค Q3 (รูปที่ 3) มีปริมาณโปรตีน 81.70 มิลลิกรัม คิดเป็น 34.9% ของโปรตีนรวมในสารสกัดตับเริ่มต้น ซึ่งพบว่าพีค Q3 มีปริมาณโปรตีนสูงกว่าพีค Q1 และพีค Q2 และเมื่อชะคอลัมน์ต่อด้วย 1 M NaCl ในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมาน้อยมาก แสดงว่าโปรตีนของสารสกัดตับมีส่วนน้อยที่ไม่จับกับคอลัมน์ Q-Sepharose แต่โปรตีนส่วนมากจับกับคอลัมน์นี้ และถูกชะออกได้เกือบหมดด้วย 0.5 M NaCl

เมื่อรวมสารละลายโปรตีนของพีค Q1, พีค Q2 และพีค Q3 ที่แยกได้จากคอลัมน์ Q-Sepharose ไปทำให้เข้มข้น แล้วไดอะไลซ์เพื่อกำจัดเกลือออกไป จากนั้นวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE และติดตามโปรตีน LGBP ด้วยวิธี Western blot กับแอนติบอดีต่อ FmrLGBP พบว่าสารละลายโปรตีนพีค Q1 และพีค Q2 ไม่เกิดปฏิกริยากับแอนติบอดี (ไม่ได้แสดงผลไว้) มีเฉพาะสารละลายโปรตีนในพีค Q3 เท่านั้นที่เกิดปฏิกริยากับแอนติบอดีต่อ FmrLGBP (รูปที่ 4B แถวที่ 4) และเมื่อวิเคราะห์แบบแผนโปรตีนของสารละลายพีค Q3 (รูปที่ 4A แถวที่ 4) ในแผ่นเจลที่ย้อมด้วยสีคูมาซีบลูพบว่าแถบโปรตีน LGBP ติดสีย้อมเข้มมากกว่าในสารสกัดตับที่ไม่ได้ผ่านการแยกด้วยคอลัมน์ Q-Sepharose (รูปที่ 4A แถวที่ 3) แต่ยังมีโปรตีนหลายแถบปนเปื้อนอยู่ในสารละลายพีค Q3 จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์โปรตีน LGBP ด้วยคอลัมน์ Q-Sepharose คอลัมน์นี้จับกับโปรตีน LGBP และสามารถกำจัดโปรตีนอื่น ๆ ออกไปได้บางส่วน (โปรตีนในพีค Q1 และ พีค Q2) รวมทั้งโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลใกล้เคียงกับโปรตีน LGBP เพราะแถบโปรตีนที่อยู่ใกล้เคียงกับแถบโปรตีน LGBP มีความเข้มหรือมีปริมาณโปรตีนลดลง (รูปที่ 4A แถวที่ 4 เทียบกับแถวที่ 3) นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีน LGBP ในสารสกัดตับของกุ้งขาวจับได้ดีกับคอลัมน์ Q-Sepharose (พีค Q3) จึงทำให้แถบโปรตีน LGBP เข้มขึ้นมากกว่าในสารสกัดตับที่แยกใน 12% SDS-PGE ด้วยปริมาณโปรตีนที่เท่ากัน (รูปที่ 4A แถวที่ 4 เทียบกับแถวที่ 3) จึงสรุปได้ว่าคอลัมน์ Q-Sepharose เป็นขั้นตอนแรกที่

Table 1 Purification of LGBP from the hepatopancreas extract

Preparation	Protein	
	Milligram	%
Hepatopancaeas extract	234	100
Q-Sepharose column peak Q1	17.52	7.5
peak Q2	4.04	1.7
peak Q3	81.70	34.9
Preparative PAGE elutate	1.82	0.77

สำนักทรัพยากรการเรียนรู้คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

เหมาะสมในการแยกโปรตีน LGBP จากสารสกัดตับของกุ้งขาว เพราะเมื่อโปรตีนที่อยู่ข้างเคียงกับแถบโปรตีน LGBP ถูกกำจัดออกไปด้วยคอลัมน์นี้ ทำให้ง่ายต่อการทำบริสุทธิ์โปรตีน LGBP ด้วยวิธี Preparative PAGE ต่อไป

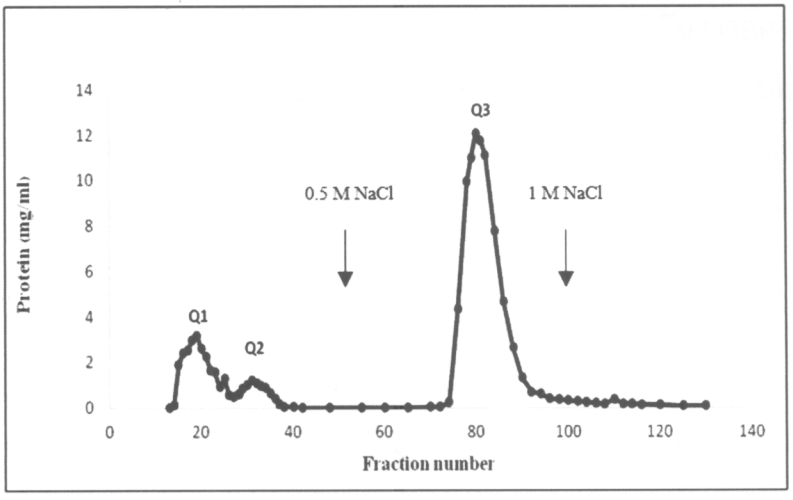

Fig.3 Purification of LGBP from the hepatopancreas extract by Q-Sepharose column. The hepatopancreas extract (234 mg) was loaded onto Q-Sepharose column (25 ml). After washing by 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 - 1 mM PMSF for 40 ml, fractions (0.8 ml) were collected with a flow rate of 0.5 ml/min. The column was subsequently eluted with 0.5 M NaCl (40 ml) and 1 M NaCl (20 ml) in the same buffer, respectively.

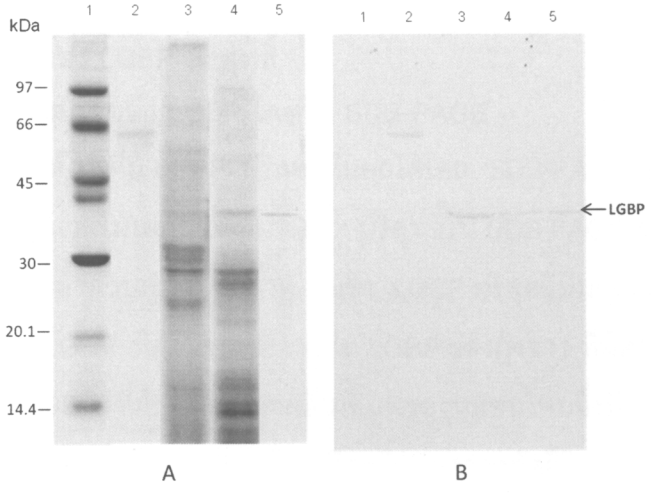

Fig. 4 Protein patterns at each purification step analyzed by 12% SDS-PAGE and Western blotting. The gel was stained with Coomassie blue (A) and LGBP was detected with anti-FmrLGBP antibody (B). Lane 1, molecular weight markers; lane 2, FmrLGBP; lane 3, hepatopancreas extract; lane 4, peak Q3 from Q-Sepharose column and lane 5, purified LGBG from Preparative PAGE.

2.2 **โดยการทำ** Preparative PAGE

จากการนำสารละลายโปรตีนเข้มข้นของพีค Q3 จากคอลัมน์ Q-Sepharose ไปแยกต่อโดย Preparative PAGE โดยเลือกสารละลายพีค Q3 เพียงบาง fraction ที่ปรากฏแถบโปรตีน LGBP อย่างชัดเจนและมีแถบโปรตีนอื่นที่อยู่ข้างเคียงเพียงเล็กน้อย ทำโดยตัดเจลเฉพาะตำแหน่งแถบโปรตีนของ LGBP เพียงแถบเดียว จากนั้นชะโปรตีนออกจากเนื้อเจล พบว่าแยกโปรตีน LGBP ได้ 1.82 มิลลิกรัม คิดเป็น 0.77 % ของโปรตีนรวมของสารสกัดตับเริ่มต้น (ตารางที่ 1) เมื่อทดสอบความบริสุทธิ์โดยวิธี SDS-PAGE และ Western blot ปรากฏโปรตีนเพียงแถบเดียวที่ย้อมติดสีคูมาซีบูล (รูปที่ 4A แถวที่ 5) และเกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อ FmrLGBP (รูปที่ 4B แถวที่ 5) บ่งชี้ว่าการทำ Preparative PAGE สามารถแยกโปรตีน LGBP ได้บริสุทธิ์

งานวิจัยนี้ ได้ทำบริสุทธิ์โปรตีน LGBP จากสารสกัดตับของกุ้งขาว โดยใช้สองขั้นตอนคือ คอลัมน์ Q-Sepharose และการทำ Preparative PAGE แม้จะแยกโปรตีน LGBP บริสุทธิ์ได้ปริมาณน้อย แต่เป็นการทำบริสุทธิ์ที่ไม่ต้องผ่านหลายขั้นตอน คล้ายกับการทำบริสุทธิ์โปรตีน BGBP จากฮีโมลิมฟ์จากกุ้ง *Farfantepenaeus paulensis* และ *Litopenaeus schmitti* โดยคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุลบเพียงขั้นตอนเดียว (Goncalves *et al.*, 2012) หรือการทำบริสุทธิ์ LGBP จากฮีโมลิมฟ์ของหนอนไหม (*Bombyx mori*) โดยอาศัยการจับระหว่างโปรตีนในฮีโมลิมฟ์กับผิวเซลล์แบคทีเรียชนิด *Enterobacter cloacae* ซึ่งแยกได้ LGBP ที่มีมวลโมเลกุล 50 kDa (Lee *et al.*, 1996) แต่การทำบริสุทธิ์ LGBP จากฮีโมไซท์ของกุ้งนางต้องแยกโดย 3 คอลัมน์ คือคอลัมน์ Blue-Sepharose ตามด้วยคอลัมน์ Phenyl-Sepharose และคอลัมน์ Sephacryl S-200 ตามลำดับ จึงจะแยกได้โปรตีน LGBP บริสุทธิ์ที่มีมวลโมเลกุล 40 kDa (Lee *et al.*, 2000)

3. การศึกษาคุณสมบัติของ LGBP บริสุทธิ์

3.1 การหามวลโมเลกุลของ LGBP โดยวิธี SDS-PAGE

จากการวิเคราะห์โปรตีน LGBP บริสุทธิ์ที่แยกได้โดย SDS-PAGE ปรากฏแถบโปรตีนเพียงแถบเดียว ซึ่งเมื่อคำนวณมวลโมเลกุลของ LGBP บริสุทธิ์ใน SDS-PAGE จากกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐาน 6 ชนิด ที่ทำควบคู่กัน (รูปที่ 5) พบว่า LGBP บริสุทธิ์มีมวลโมเลกุล 40.73 kDa ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับโปรตีน LGBP ที่คำนวณได้จากยีน LGBP ของกุ้งขาว ที่มีค่าเป็น 41.6 kDa รวมทั้งใกล้เคียงกับของโปรตีน LGBP ที่ทำบริสุทธิ์จากฮีโมลิมฟ์ของหนอนไหมซึ่งมีมวลโมเลกุลเป็น 50 kDa (Lee *et al.*, 1996) และของโปรตีน LGBP ที่ทำบริสุทธิ์จากสารสกัดฮีโมไซท์ของกุ้งนาง ที่มีขนาด 36 kDa และ 40 kDa ในสภาวะไม่รีดิวซ์และรีดิวซ์ ตามลำดับ และพบว่าโปรตีน LGBP ของกุ้งนางประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์เพียงชนิดเดียว (Lee *et al.*, 2000) งานวิจัยนี้จึงหามวลโมเลกุลของโปรตีน LGBP บริสุทธิ์ของกุ้งขาวด้วยวิธี SDS-PAGE เท่านั้น ประกอบกับรายงานวิจัยต่าง ๆ บ่งชี้ว่าโปรตีน LGBP ของกุ้งประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์เพียงสายเดียว ไม่มีหน่วยย่อย (subunit)

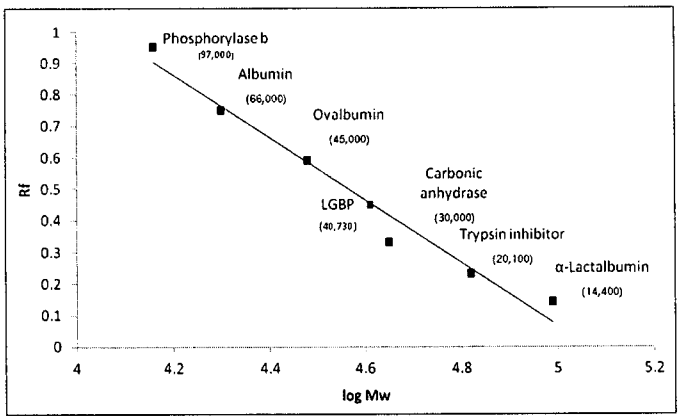

Fig. 5 Standard graph for M_r determination of purified LGBP by 12% SDS-PAGE.

รายงานการทำบริสุทธิ์โปรตีน LGBP มีไม่มากนัก ส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษาการโคลนยีน LGBP และการผลิตโปรตีนลูกผสม โดยสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนมีรายงานว่าโปรตีน LGBP มีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 40 - 50 kDa เช่น มวลโมเลกุลของโปรตีน LGBP ที่แปลมาจากยีน LGBP ของปูก้ามขนหรือปูเชี่ยงไฮ้ (Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*) มีค่าเป็น 39.89 kDa (Zhao *et al.*, 2009) ของกุ้ง *L. stylirostris* มีค่าเป็น 44 kDa (Roux *et al.*, 2002) ของกุ้งขาวมีค่าเป็น 39.92 kDa (Cheng *et al.*, 2005) ของกุ้งลายเสือ (Kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*) มีค่าเป็น 40.15 kDa (Lin *et al.*, 2008) ของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) มีค่าเป็น 41.2 kDa (Yeh *et al.*, 2009) ของกุ้งแชบ๊วย มีค่าเป็น 41.6 kDa (Rattanaporn, 2010) และโปรตีนลูกผสม LGBP ของกุ้งแชบ๊วยมีมวลโมเลกุล 40 kDa (อารีรัตน์ เชาว์สมบูรณ์ และคณะ, 2556) ในขณะที่ โปรตีนลูกผสม LGBP ของกุ้งขาวจีนมีมวลโมเลกุล 46 kDa (Du *et al.*, 2007) และของกุ้งกุลาดำมีมวลโมเลกุล 40 kDa (Amparyup *et al.*, 2012)

3.2 การทดสอบการกระตุ้นแอคทิวิทีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสโดย LGBP

เนื่องจากในการศึกษาเบื้องต้นพบว่าสารสกัดฮีโมไซท์มีแอคทิวิทีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และจากรายงานของ Amparyup และคณะ (2012) พบว่าโปรตีนลูกผสมของ LGBP สามารถกระตุ้นแอคทิวิทีของเอนไซม์นี้ในสารสกัดฮีโมไซท์ของกุ้งกุลาดำได้ งานวิจัยนี้จึงได้ทดสอบผลของ LGBP บริสุทธิ์โดยการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในสารสกัดฮีโมไซท์ปริมาณโปรตีน 100 ไมโครกรัม ในสภาวะที่ไม่บ่มและผ่านการบ่มกับ LGBP บริสุทธิ์ ปริมาณ 2 ไมโครกรัม พบว่าแอคทิวิทีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในสารสกัดฮีโมไซท์ที่มีการบ่มกับ LGBP บริสุทธิ์ มีค่าเพิ่มขึ้น 190% เมื่อเทียบกับแอคทิวิทีของเอนไซม์ที่ไม่ได้บ่มกับ LGBP บริสุทธิ์ (100%) บ่งชี้ว่าโปรตีน LGBP บริสุทธิ์ของกุ้งขาวสามารถกระตุ้นแอคทิวิทีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในสารสกัดฮีโมไซท์ได้ และกระตุ้นได้ดีกว่าโปรตีนลูกผสม LGBP ของกุ้งกุลาดำที่สามารถกระตุ้นแอคทิวิทีของเอนไซม์นี้ได้ 104% เมื่อใช้สารสกัด

ฮีโมไซท์ ปริมาณโปรตีน 250 ไมโครกรัม บ่มกับโปรตีนลูกผสม LGBP ปริมาณ 160 ไมโครกรัม (Amparyup *et al.*, 2012)

นอกจากนี้ จากที่มีรายงานว่าเบตา-1,3-กลูแคน ลิโพโพลีแซคคาไรด์ (LPS) หรือ lipoteichoic acid (LTA) ซึ่งเป็นโพลีแซคคาไรด์บนผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ สามารถกระตุ้นแอคทิวิทีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสได้ (Söderhäll,1982; Söderhäll and Cerenius, 1998) งานวิจัยนี้จึงได้บ่มสารสกัดฮีโมไซท์ของกุ้งขาว ปริมาณโปรตีน 100 ไมโครกรัม กับ LPS, LTA หรือ laminarin (เบตา-1,3-กลูแคน) อย่างละ 5 ไมโครกรัม พบว่า LPS กระตุ้นแอคทิวิทีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสได้ โดยมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 530% ส่วน LTA และ laminarin สามารถกระตุ้นแอคทิวิทีของเอนไซม์ เพิ่มขึ้นเป็น 190 และ 160% ตามลำดับ

ในทำนองเดียวกัน เมื่อวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของสารสกัดฮีโมไซท์ของกุ้งขาว (ปริมาณโปรตีน 100 ไมโครกรัม) ในสภาวะที่มีโปรตีน LGBP บริสุทธิ์ (2 ไมโครกรัม) และมี LPS, LTA หรือ laminarin อย่างละ 5 ไมโครกรัม พบว่า LPS สามารถกระตุ้นแอคทิวิทีของเอนไซม์ได้ โดยเพิ่มมากขึ้นเป็น 1,280% ส่วน LTA และ laminarin สามารถกระตุ้นแอคทิวิทีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสได้เพิ่มขึ้นเป็น 240 และ 195% ตามลำดับ บ่งชี้ว่า LPS ซึ่งเป็นลิโพโพลีแซคคาไรด์บนผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบซึ่งมักเป็นเชื้อก่อโรคในกุ้ง สามารถจับกับโปรตีน LGBP ได้ดีกว่า LTA ซึ่งเป็นโพลีแซคคาไรด์บนผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก หรือกับเบตา-1,3-กลูแคนที่พบมากบนผนังเซลล์ของยีสต์ แล้วไปกระตุ้นเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสให้ active ขึ้น จึงพบแอคทิวิทีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในสภาวะที่มี LPS อยู่ด้วยเพิ่มขึ้น และเพิ่มมากกว่าการมี LTA หรือเบตา-1,3-กลูแคน เนื่องจากโปรตีน LGBP บริสุทธิ์ของกุ้งขาวสามารถกระตุ้นแอคทิวิทีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในสารสกัดฮีโมไซท์ และกระตุ้นได้ดีมากขึ้นในสภาวะที่มี LPS ซึ่งดีกว่าสภาวะที่มีเบตา-1,3-กลูแคน หรือ LTA เป็นไปได้ว่าเมื่อมีการบุกรุกของเชื้อก่อโรคแบคทีเรียแกรมลบ โปรตีน LGBP ไปจับกับ LPS ซึ่งเป็นโพลีแซคคาไรด์บนผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ แล้วไปจับกับตัวรับบนเมมเบรนของเซลล์ฮีโมไซท์เพื่อเกิดการสลายกรานูลให้หลั่งโปรฟีนอลออกซิเดสและเอนไซม์ protease ออกมา เพื่อเปลี่ยนโปรฟีนอลออกซิเดสไปเป็นเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่ active จึงวัดระดับแอคทิวิทีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเพิ่มสูงขึ้นได้ จากนั้นเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสไปสังเคราะห์เมลานินเพื่อกำจัดจุลินทรีย์บุกรุกต่อไป (Aspan and Söderhäll, 1991; Aspan *et al.*, 1995; Söderhäll,1982; Söderhäll and Ajaxon, 1982; Söderhäll and Cerenius, 1998) ส่วนการที่ LTA ซึ่งเป็นโพลีแซคคาไรด์บนผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก หรือเบตา-1,3-กลูแคนที่พบมากบนผนังเซลล์ของยีสต์ มีส่วนช่วยโปรตีน LGBP บริสุทธิ์กระตุ้นแอคทิวิทีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในสารสกัดฮีโมไซท์ได้น้อยกว่า LPS มาก อาจเป็นเพราะยีสต์และแบคทีเรียแกรมบวกไม่ได้เป็นเชื้อก่อโรคโดยตรงในกุ้งขาว จึงส่งผลต่อการตอบสนองต่อเชื้อบุกรุกได้น้อยกว่า นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาการจับของโปรตีนลูกผสม LGBP จากกุ้งขาวจีนกับจุลินทรีย์ พบว่าโปรตีนลูกผสมนี้สามารถจับกับจุลินทรีย์ได้หลายชนิด แต่จับกับแบคทีเรียแกรมลบได้ดีที่สุด และจับกับ

แบคทีเรียแกรมบวกและยีสต์ได้เล็กน้อยหรือไม่มีการจับเลย (Du *et al.*, 2006) อย่างไรก็ตามงานผลงานวิจัยนี้สามารถแสดงให้เห็นว่า LGBP เป็น PRP ชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในกลไกการป้องกันตนเองตอบสนองต่อเชื้อก่อโรคที่บุกรุก

ดังได้กล่าวแล้วข้างต้นว่าผลงานวิจัยนี้ยังไม่ได้เตรียมต้นฉบับเพื่อตีพิมพ์เผยแพร่ จึงขอไม่ระบุรายละเอียดของผลงานวิจัยในลักษณะรูปหรือตาราง รวมทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่โคลนได้ไว้ในรายงานฉบับสมบูรณ์นี้

4. การทดสอบการเกาะกลุ่มแบคทีเรียโดยโปรตีน LGBP บริสุทธิ์

จากการทดสอบผลของโปรตีน LGBP บริสุทธิ์ ในการกระตุ้นการเกาะกลุ่มแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* โดยเปรียบเทียบในสภาวะที่มีและไม่มี Ca^{2+} และใช้โปรตีน BSA แทนโปรตีน LGBP บริสุทธิ์เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม พบว่าโปรตีน LGBP บริสุทธิ์สามารถเหนี่ยวนำให้ *V. parahaemolyticus* เกิดการเกาะกลุ่มได้อย่างสมบูรณ์ด้วยค่าความเข้มข้นที่น้อยสุดคือ 12.5 µg/ml ในสภาวะมี Ca^{2+} (รูปที่ 6B) ไม่พบการเกาะกลุ่มของแบคทีเรียในสภาวะที่ไม่มี Ca^{2+} (รูปที่ 6C) บ่งชี้ว่าการเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มของแบคทีเรียโดยโปรตีน LGBP บริสุทธิ์ต้องการ Ca^{2+} ซึ่งยืนยันได้จากการทดสอบในสภาวะที่มี 10 mM EDTA พบว่าไม่มีการเกาะกลุ่มของแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* เกิดขึ้นเช่นกัน (รูปที่ 6F) เนื่องจาก EDTA มีคุณสมบัติเป็น chelating agent สามารถจับกับ Ca^{2+} ได้ ทำให้ไม่มี Ca^{2+} อิสระเหลืออยู่ จึงทำให้ยืนยันได้ว่าการเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มแบคทีเรียของโปรตีน LGBP บริสุทธิ์ต้องการ Ca^{2+} เป็นตัวช่วยในการเกิดปฏิกิริยา

V. parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียแกรมลบจัดอยู่ในสกุล *Vibrio* ซึ่งปัจจุบันมีรายงานว่าเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการระบาดของโรคตายด่วนในกุ้งขาว โดยแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* มี LPS เป็นองค์ประกอบหลักบนผนังเซลล์ จึงทำให้โปรตีน LGBP ซึ่งเป็น PRP จดจำและจับจำเพาะกับ LPS บนผนังเซลล์จุลินทรีย์ (Kim *et al.*, 2000) จึงเหนี่ยวนำให้ *V. parahaemolyticus* เกิดการเกาะกลุ่มได้ จึงจัดได้ว่า LGBP มีคุณสมบัติเป็นเลคตินชนิดหนึ่ง และงานวิจัยนี้พบว่าการเกาะกลุ่มแบคทีเรียเกิดได้ดีในสภาวะที่มี Ca^{2+} แม้ว่าการศึกษาคุณสมบัติของยีน LGBP ยังไม่มีการรายงานตำแหน่งที่จับจำเพาะกับ Ca^{2+} (calcium binding site) แต่เป็นไปได้ว่า Ca^{2+} จะช่วยโปรตีน LGBP ในเกาะกลุ่มแบคทีเรีย เช่นเดียวกันกับโปรตีนลูกผสมของเลคตินแบบ C (C-type lectin) ที่มีโดเมนจดจำคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate recognition domain) 2 ตำแหน่ง เช่นเลคติน FcLec2 ของกุ้งขาวจีนที่สามารถจับ (bind) กับแบคทีเรียได้โดยไม่ต้องอาศัย Ca^{2+} แต่ต้องการ Ca^{2+} เป็นตัวช่วยทำให้แบคทีเรียเกิดการเกาะกลุ่ม ส่วนกลไกการเกิดเป็นเช่นไรยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด (Zhang *et al.*, 2009) เช่นเดียวกับเลคตินแบบ C จากกุ้งในสกุลพีเนียสเช่น กุ้ง *P. monodon*, *P. stylirostris* , *P. californiensis* และ *Parapenaeus longirostris* ที่ต้องการ Ca^{2+} ในการเกาะกลุ่มจุลินทรีย์ (Rittidach *et al.*, 2007)

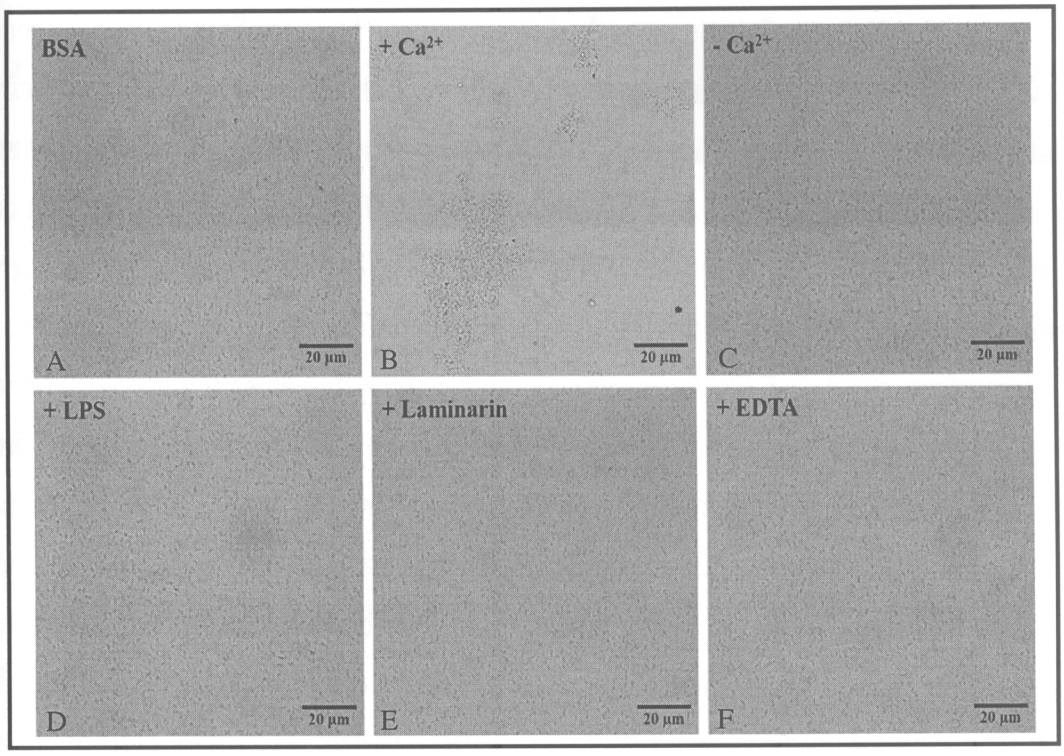

Fig. 6 Agglutination of *V. parahaemolyticus* induced by purified LGBP. Bacteria were agglutinated by 12.5 µg/ml purified LGBP in the presence of various contidions as follows: A, BSA was used instead of purified LGBP; B, with 10 mM $CaCl_2$; C, with out 10 mM $CaCl_2$: D, with 1.25 mg/ml LPS and 10 mM $CaCl_2$; E, with 2.5 mg/ml laminarin and 10 mM $CaCl_2$ and F, with 10 mM EDTA.

นอกจากนี้มีรายงานการเกาะกลุ่มแบคทีเรียของโปรตีนลูกผสม LGBP จากหอยเชลล์ ที่ความเข้มข้น 40 µg/ml สามารถทำให้ยีสต์ *Pichia pastoris* และ แบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus subtilis* เกิดการเกาะกลุ่มได้ (Yang *et al.*, 2010) เนื่องจากยีสต์มีเบตา-1,3-กลูแคนเป็นองค์ประกอบหลักบนผนังเซลล์จึงทำให้โปรตีน LGBP สามารถจับจำเพาะกับเบตา-1,3-กลูแคนของยีสต์และเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มได้ สำหรับแบคทีเรียแกรมบวก *B. subtilis* ก็มี LPS อยู่บ้างบนองค์ประกอบของผนังเซลล์ ดังนั้นจึงสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มในแบคทีเรียแกรมบวกได้เช่นกัน โดยผลที่ได้คล้ายกับการทดสอบการเกาะกลุ่มแบคทีเรียของโปรตีนลูกผสม BGBP ในหนอนใบยาสูบ (*Manduca sexta)* ซึ่งเป็น PRP ชนิดหนึ่งที่จดจำและจับจำเพาะกับเบตา-1,3-กลูแคนบนผนังเซลล์จุลินทรีย์แต่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มได้ทั้งในแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก *E. coli* ที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (Ma and Kanost, 2000)

จากผลการทดสอบใช้โปรตีน BSA แทนโปรตีน LGBP บริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่า ไม่มีการเกาะกลุ่มของ *V. parahaemolyticus* เกิดขึ้น (รูปที่ 6A) ในขณะที่ โปรตีน LGBP บริสุทธิ์ที่ความ

เข้มข้นเท่ากันคือ 12.5 µg/ml สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มของ *V. parahaemolyticus* ในสภาวะที่มี Ca^{2+} ได้ บ่งชี้ว่าการเกาะกลุ่มของแบคทีเรียเป็นผลจากการจับระหว่างโปรตีน LGBP บริสุทธิ์กับน้ำตาลบบผิวเซลล์ของแบคทีเรีย เพื่อทดสอบความจำเพาะของการจับระหว่าง LGBP กับน้ำตาลบนผิวเซลล์แบคทีเรีย โดยดูผลการยับยั้งการเกาะกลุ่ม *V. parahaemolyticus* ด้วย LPS และ laminarin พบว่า LPS ยับยั้งการเกาะกลุ่มได้ที่ความเข้มข้นน้อยที่สุด 1.25 mg/ml (รูปที่ 6D) และ laminarin ที่ความเข้มข้น 2.5 mg/ml (รูปที่ 6E) แสดงให้เห็นว่าโปรตีน LGBP บริสุทธิ์จากกุ้งขาวมีความจำเพาะกับทั้ง LPS และเบตา-1,3-กลูแคน แต่มีความจำเพาะกับ LPS มากกว่า เนื่องจากใช้ความเข้มข้นน้อยกว่าก็สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ได้ดี ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานที่โปรตีน LGBP บริสุทธิ์ของกุ้งนางสามารถจับจำเพาะกับ LPS ได้ดี และจับกับเบตา-1,3-กลูแคน ได้เช่นกัน (Lee *et al.*, 2000) โปรตีนลูกผสม LGBP จากกุ้งกุลาดำสามารถจับจำเพาะได้ทั้ง LPS และ laminarin (Amparyup *et al.*, 2012) คล้ายกับโปรตีนลูกผสมของหอยเชลล์ *Chlamys farreri* ที่สามารถจับจำเพาะกับ LPS ได้ดีกว่าเบตา-1,3-กลูแคน (Siva *et al.*, 2000) ส่วนโปรตีน BGBP บริสุทธิ์ที่ได้จากฮีโมไซท์ของกุ้งกุลาดำ สามารถจับเฉพาะกับเบตา-1,3-กลูแคนคือ curdlan และ zymosan แต่ไม่สามารถจับกับ LPS บ่งชี้ว่าโปรตีน BGBP เป็น PRP ที่สามารถจับจำเพาะกับเบตา-1,3-กลูแคนเท่านั้น (Sritunyalucksana *et al.*, 2002) ในขณะที่ โปรตีน LGBP จับจำเพาะได้ทั้ง LPS และเบตา-1,3-กลูแคน ดังนั้น LPS และเบตา-1,3-กลูแคนจึงยับยั้งการเกาะกลุ่มแบคทีเรียที่เหนี่ยวนำโดยโปรตีน LGBP ได้ การเกาะกลุ่มของแบคทีเรียถือเป็นกลไกด่านแรกของการกำจัดจุลินทรีย์บุกรุก โดยจะช่วยไม่ให้แบคทีเรียแพร่กระจายในตัวกุ้ง ทำให้เซลล์ฮีโมไซท์สามารถกำจัดแบคทีเรียได้เร็วขึ้น บ่งชี้ว่าโปรตีน LGBP บริสุทธิ์จากกุ้งขาวเป็น PRP ที่จับจำเพาะกับ LPS และเบตา-1,3-กลูแคนบนองค์ประกอบของผนังเซลล์จุลินทรีย์ และมีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองจากเชื้อก่อโรคในกุ้งขาว

5. การทดสอบการจับระหว่าง LGBP กับแบคทีเรีย

เพื่อทดสอบการจับ (binding) ของโปรตีน LGBP บริสุทธิ์กับแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง นำ LGBP บริสุทธิ์บ่มกับแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ($5x10^7$ เซลล์) ในบัฟเฟอร์ TBS ในสภาวะที่มีและไม่มี Ca^{2+} จากนั้นเซนตริฟิวจ์ แยกส่วนใสคือโปรตีน LGBP บริสุทธิ์ที่ไม่จับกับเซลล์ (unbound) ออกจากตะกอนเซลล์แบคทีเรีย หลังล้างตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ ชะโปรตีน LGBP บริสุทธิ์ออกจากตะกอนของเซลล์แบคทีเรียด้วย 7% SDS แล้ววิเคราะห์ผลด้วย SDS-PAGE และ Western blot ต่อแอนติบอดีต่อ FmrLGBP พบว่าในสภาวะที่มี Ca^{2+} โปรตีน LGBP บริสุทธิ์จับกับเซลล์ *V. parahaemolyticus* ได้อย่างสมบูรณ์ โดยไม่พบโปรตีน LGBP บริสุทธิ์ในส่วนใสก่อนล้างเซลล์ (unbound) (ไม่ได้แสดงผลไว้) และยืนยันได้จากการชะโปรตีน LGBP ออกจากตะกอนเซลล์ด้วย 7% SDS ที่ปรากฏแถบของโปรตีน LGBP บริสุทธิ์อย่างชัดเจนในการทำ Western blot (รูปที่ 7 แถวที่ 3) โดยมีความเข้มของแถบใกล้เคียงกับโปรตีนที่ใช้ในการทดลอง (รูปที่ 7 แถวที่ 2) แต่ในสภาวะที่ไม่มี Ca^{2+} พบว่าโปรตีน LGBP บริสุทธิ์ จับกับ

เซลล์ *V. parahaemolyticus* น้อยลงเห็นได้จากแถบโปรตีนที่ถูกชะมีความเข้มจางลง (รูปที่ 7 แถวที่ 4) ผลการทดลองเหล่านี้บ่งชี้ว่าโปรตีน LGBP บริสุทธิ์สามารถจับกับแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ได้โดยตรง และเกิดขึ้นในสภาวะที่มี Ca^{2+} ได้ดีกว่าในสภาวะที่ไม่มี Ca^{2+} หรือกล่าวได้ว่าโปรตีน LGBP บริสุทธิ์จากกุ้งขาวต้องการ Ca^{2+} ช่วยในการจับกับเซลล์แบคทีเรีย สอดคล้องกับการเหนี่ยวนำให้ *V. parahaemolyticus* เกิดการเกาะกลุ่มที่ต้องการ Ca^{2+} ในการทำปฏิกิริยาการจับของโปรตีน LGBP กับแบคทีเรียเกิดขึ้นได้จากการจดจำและจับจำเพาะกับองค์ประกอบบนผนังเซลล์จุลินทรีย์ นั่นคือ LPS ที่เป็นองค์ประกอบของแบคทีเรียแกรมลบ และเบตา-1,3-กลูแคนที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ยีสต์ ได้ สอดคล้องกับการจับของโปรตีน LGBP บริสุทธิ์จากกุ้งนางที่สามารถจับจำเพาะกับ LPS และเบตา-1,3-กลูแคน และโปรตีนลูกผสม LGBP ของกุ้งกุลาดำและหอยเซลล์ก็เช่นกัน พบว่าสามารถจับจำเพาะได้ทั้ง LPS และ laminarin (Amparyup *et al.*, 2012, Siva *et al.*, 2000) ส่วนโปรตีนลูกผสม LGBP จากกุ้งขาวจีนจับกับแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบได้ดีที่สุด และยังสามารถจับกับแบคทีเรีย *Micrococcus luteus* และ *Bacillus megaterium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก และยีสต์ *Pichia pastoris* ได้ด้วย จากรายงานเหล่านี้สรุปได้ว่าโปรตีน LGBP สามารถจับกับจุลินทรีย์ได้หลายชนิด แต่ความสามารถในการจับขึ้นอยู่กับความจำเพาะกับจุลินทรีย์นั้น ๆ โดยจับกับแบคทีเรียแกรมลบได้ดีที่สุดและจับกับแบคทีเรียแกรมบวกและยีสต์ได้เล็กน้อย หรือไม่มีการจับเลย (Du *et al.*, 2006)

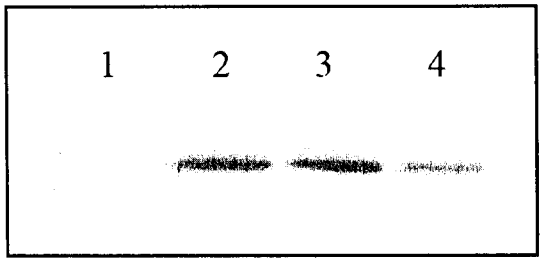

Fig. 7 Binding of *V. parahaemolyticus* to purified LGBP. Binding of bacteria to purified LGBP was analyzed by Western blotting. Lane 1, standard protein markers; lane 2, purified LGBP; lane 3, bound LGBP in the presence of 10 mM $CaCl_2$ and lane 4, bound LGBP in the absence of $CaCl_2$.

5. การสร้าง cDNA สายเต็มและศึกษาสมบัติของยีน LGBP

งานวิจัยนี้ได้โคลน cDNA ชิ้นกลางของยีน LGBP ที่มีขนาด 732 คู่เบส และ cDNA ชิ้นปลาย 5' และ 3' ที่มีขนาด 1,079 และ 908 คู่เบส ตามลำดับ จากนั้นนำไปสร้างยีน LGBP สายเต็ม (รูปที่ 8) พบว่ามีขนาด 1,282 คู่เบส ที่ประกอบด้วย 1 5' untranslated region (UTR, 21 คู่เบส) มี 1 3' UTR (160 คู่เบส) และมี 1 open reading frame (ORF) ยาว 1,101 คู่เบส ซึ่ง encode สายเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 367 หน่วย และมี 1 signal peptide จากการแปลง cDNA สายเต็มของยีน LGBP ไปเป็น

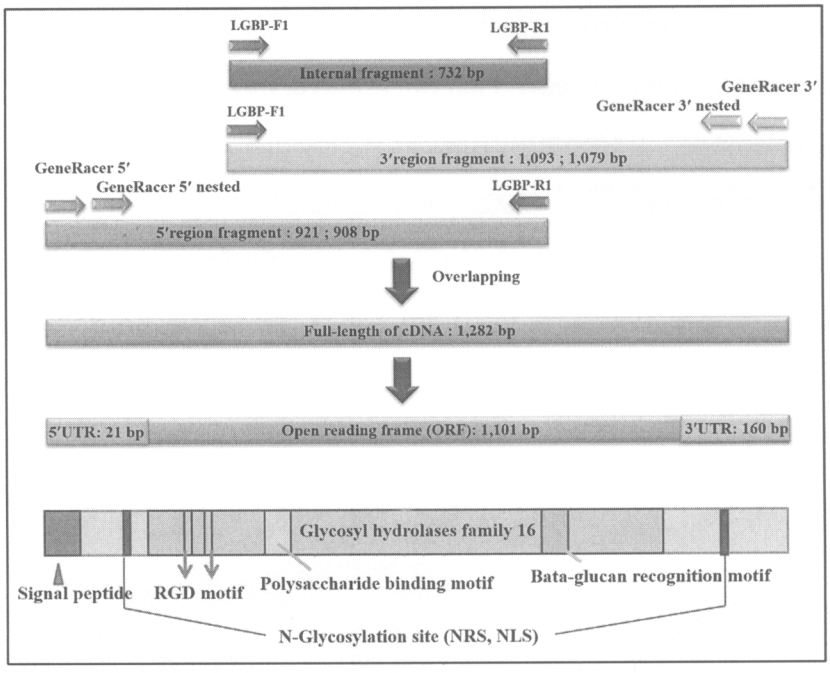

Fig. 8 Cloning strategy and structure of the full-length cDNA of LGBP gene. Internal LGBP cDNA fragment was cloned by using hepatopancreas RNA and one pair of primers, LGBP-F1 and LGBP-R1. 5' and 3' RACE approach was used to clone 5' and 3' cDNA ends. A full-length LGBP cDNA was reconstructed from overlapping of these sequences.

deduced amino acid sequence พบว่า LGBP ของกุ้งขาว มี 2 integrin binding motif (RGD), 1 glycosyl hydrolase domain, 1 β-glucan recognition motif, 1 polysaccharide binding motif, 1 protein kinase C phosphorylation site, 2 N-glycosylation site (NRS และ NLS) และไม่มี O-linked glycosylation site (รูปที่ 8) และมีมวลโมเลกุล 41.6 kDa มีขนาดใกล้เคียงกับ LGBP บริสุทธิ์ที่วิเคราะห์โดย SDS-PAGE (40.73 kDa, รูปที่ 5) ยีน LGBP ที่โคลนจากตับของกุ้งขาวมีขนาด และคุณสมบัติคล้ายกับยีน LGBP ที่โคลนจากเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งชนิดอื่น ๆ ดังเช่น ยีน LGBP ที่โคลนจากตับของกุ้ง *L. stylirostris* (Roux *et al.*, 2002) จากฮีโมไซท์ของกุ้งขาว (Cheng *et al.*, 2005) จากฮีโมไซท์ของกุ้งลายเสือ (Lin *et al.*, 2008) จากฮีโมไซท์ของกุ้งแชบ๊วย (Rattanaporn, 2010) และยีน LGBP จากกุ้งก้ามกราม (Yeh *et al.*, 2009) นอกจากนี้ จากการ BLAST ลำดับนิวคลีโอไทด์สายเต็มของยีน LGBP ของกุ้งขาวเปรียบเทียบกับของกุ้งชนิดอื่น ๆพบว่ายีน LGBP ของกุ้งขาวมีความเหมือน (identity) กับของกุ้งแชบ๊วยมากที่สุด (95%) รองลงมาตามลำดับคือยีน LGBP ของกุ้ง *L. stylirostris* 94%, กุ้งขาวจีน 93%, กุ้งกุลาดำ 91% และกุ้งลายเสือ 86%

6. การแสดงออกของยีน LGBP ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน LGBP ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งขาวด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ cDNA ชิ้นกลางเป็น probe ที่จำเพาะของยีน LGBP และใช้ 18S rRNA เป็น internal standard พบว่า LGBP mRNA แสดงออกมากสุดในตับ พบรองลงมาคือในหัวใจและเหงือก โดยไม่พบในเนื้อเยื่ออื่น ๆ

ของกุ้งขาว (รูปที่ 9) บ่งชี้ว่าตับเป็นเนื้อเยื่อหลักในการสังเคราะห์โปรตีน LGBP ในกุ้งขาว ซึ่งสอดคล้องกับการพบโปรตีน LGBP เฉพาะในตับจากการทำ Western blot นอกจากนี้มีรายงานการแสดงออกของยีน LGBP ในเนื้อเยื่อของกุ้งต่าง ๆ เช่นพบในตับของกุ้ง *L. stylirostris* (Roux *et al.*, 2002) ในตับและ ฮีโมไซท์ของกุ้งขาว (Cheng *et al.*, 2005) ในฮีโมไซท์ของกุ้งขาวจีน (Du *et al.*, 2006) ในกุ้งแชบ๊วยมีการแสดงออกในตับมากกว่าในฮีโมไซท์ (Rattanaporn, 2010) ในกุ้ง *Fenneropenaeus indicus* มีการแสดงออกของยีน LGBP ในฮีโมไซท์ ตับ และพบเล็กน้อยในหัวใจ (Valli and Vaseeharan, 2012)

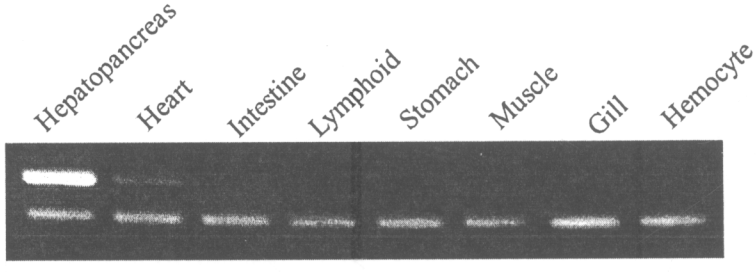

Fig. 9 RT-PCR analysis of the LGBP mRNA expression in different tissues. Total RNA was extracted from various tissues. RT-PCR products were amplified by using the primers that were specific to LGBP gene and 18S rRNA. RT-PCR of 18S rRNA transcript was a control to demonstrate that the same amount of RNA template was used in each sample.

จากรายงานการแสดงออกของยีน LGBP ในกุ้งชนิดต่าง ๆ พบว่าส่วนใหญ่มีการแสดงออกในตับมากกว่าในเซลล์ฮีโมไซท์ และเนื่องจากตับเป็นอวัยวะหนึ่งที่สำคัญซึ่งเป็นแหล่งสังเคราะห์และสะสมโปรตีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาผลการตอบสนองของยีน LGBP ในการบ่มตับกับเชื้อก่อโรค

7. การศึกษาผลการบ่มตับกับจุลินทรีย์ก่อโรคต่อการแสดงออกของยีน LGBP

จากการวัดการแสดงออกของยีน LGBP ในชิ้นตับของกุ้งขาวที่บ่มกับบัฟเฟอร์ที่มีหรือไม่มีจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี RT-PCR เชิงปริมาณ และใช้ยีน 18S rRNA เป็น internal standard เมื่อเทียบกับค่าเริ่มต้นที่ชั่วโมง 0 ก่อนบ่ม พบว่า LGBP mRNA ของตับกุ้งชุดควบคุมที่บ่มด้วย K-199 มีการแสดงออกไม่แตกต่างกันตลอดช่วงเวลา 0 - 4 ชั่วโมง หลังการบ่ม ในทำนองเดียวกัน จากการบ่มตับกับแบคทีเรีย *V. harveyi* พบว่ายีน LGBP มีการแสดงออกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญตลอดช่วงเวลา 0 - 4 ชั่วโมงหลังการบ่ม และไม่ต่างจากชุดควบคุม (ไม่ได้แสดงผลวิจัยไว้) บ่งชี้ว่า *V. harveyi* ไม่ได้เป็นเชื้อก่อโรคของกุ้งขาว ในขณะที่เมื่อบ่มชิ้นตับกับแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* พบการแสดงออกของ LGBP mRNA เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจากชั่วโมงที่ 0.5 เมื่อเทียบกับชั่วโมงที่ 0 ก่อนบ่ม จนมีค่าเพิ่มสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 2.5 - 3 จากนั้นมีค่าลดลง ณ ชั่วโมงที่ 3.5 และลดมากที่ 4 ชั่วโมงหลังการบ่ม (รูปที่ 10A) จากผลงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการบ่มตับของกุ้งขาวกับ *V. parahaemolyticus* โดยตรง จะกระตุ้นการ

แสดงออกของยีน LGBP ซึ่งตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อแบคทีเรีย และ *V. parahaemolyticus* น่าจะเป็นแบคทีเรียก่อโรคของกุ้งขาว ในทำนองเดียวกัน เมื่อบ่มชิ้นตับกับไวรัสก่อโรคกุ้ง WSSV พบว่ายีน LGBP ในตับถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกเพิ่มตามลำดับจากชั่วโมงที่ 0 และมีค่าสูงสุดที่ 1 ชั่วโมงหลังการบ่ม จากนั้นการแสดงเริ่มลดลงตามเวลา จนถึงชั่วโมงที่ 4 หลังการบ่ม (รูปที่ 10B) บ่งชี้ว่า WSSV เป็นไวรัสก่อโรคของกุ้งขาว ซึ่งกระตุ้นให้ยีน LGBP แสดงออกมากขึ้น สอดคล้องกับยีน LGBP ที่ถูก up-regulate ในกุ้ง *P. stylirostris* ที่ถูกฉีดด้วย WSSV (Roux *et al.*, 2002) นอกจากนี้มีรายงานการแสดงออกของยีน LGBP ที่เพิ่มขึ้นตอบสนองต่อการฉีดด้วยเชื้อก่อโรคหรือองค์ประกอบของผิวเซลล์จุลินทรีย์ในกุ้งชนิดต่าง ๆ มีดังนี้ ในกุ้งขาวต่อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* (Cheng *et al.*, 2005) ในกุ้งขาวจีนต่อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *Vibrio anguillarum* (Du et al., 2006) ในกุ้งแชบ๊วยต่อแบคทีเรีย *V. harveyi* (Rattanaporn, 2010) ในกุ้งกุลาดำต่อ *V. harveyi* (Amparyup *et al.*, 2012) ส่วนยีน LGBP ในหอยมุก *Pinctada fucata* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS (Zhang *et al.*, 2009) ผลงานวิจัยเหล่านี้บ่งชี้ว่ายีน LGBP มีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งตอบสนองต่อเชื้อก่อโรค

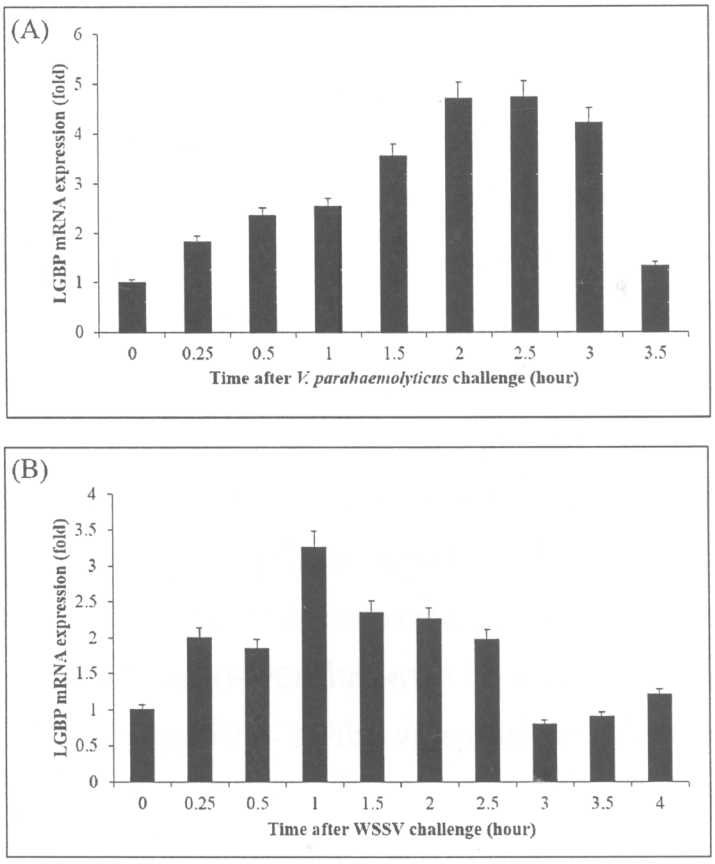

Fig. 10 Expression of LGBP mRNA in the hepatopancreas at different time intervals in response to challenge with *V. parahaemolyticus* or WSSV. Time-course expression of LGBP in the hepatopancreas fragments after incubating with *V. parahaemolyticus* (A) or WSSV (B), was determined by semiquantitative RT-PCR using 18S rRNA as an internal control.

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ทำบริสุทธิ์โปรตีน LGBP โคลนและศึกษาคุณสมบัติของยีน LGBP จากตับของกุ้งขาว รวมทั้งศึกษาการแสดงออกของยีน LGBP ตอบสนองต่อเชื้อก่อโรคกุ้ง ซึ่งมีผลสรุปดังนี้

1. โปรตีน LGBP ของกุ้งสามารถเกิดปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับแอนติบอดีต่อโปรตีนลูกผสม FmrLGBP ของกุ้งแชบ๊วย และพบการกระจายของโปรตีน LGBP มากเฉพาะในสารสกัดตับของกุ้งขาว โดยไม่พบโปรตีนนี้ในฮีโมลิมฟ์และในสารสกัดฮีโมไซท์

2. สามารถทำให้โปรตีน LGBP บริสุทธิ์จากสารสกัดตับของกุ้งขาว ด้วยการแยกด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุลบ Q-Sepharose ตามด้วยการทำ Preparative PAGE ซึ่งแยกได้โปรตีน LGBP บริสุทธิ์มีปริมาณโปรตีนรวม 1.82 มิลลิกรัม คิดเป็น 0.77 % ของโปรตีนรวมของสารสกัดตับเริ่มต้น

3. โปรตีน LGBP บริสุทธิ์ปรากฏเพียงแถบเดียวในการวิเคราะห์ด้วย 12% SDS-PAGE ซึ่งคำนวณมวลโมเลกุลได้เป็น 40.73 kDa

4. โปรตีน LGBP บริสุทธิ์สามารถกระตุ้นแอคทิวิทีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในสารสกัดฮีโมไซท์เพิ่มเป็น 190% และกระตุ้นแอคทิวิทีเพิ่มเป็น 240 และ 195% ในสภาวะที่มี LTA และเบตา-1,3-กลูแคน ตามลำดับ นอกจากนี้ยังกระตุ้นแอคทิวิทีได้มากสุดเป็น 1,280% ในสภาวะที่มี LPS

5. โปรตีน LGBP บริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้น 12.5 µg/ml สามารถเหนี่ยวนำให้แบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* เกิดการเกาะกลุ่มได้ และต้องการ Ca^{2+} ในการเกิดปฏิกิริยา รวมทั้งการเกาะกลุ่มของแบคทีเรียชนิดนี้ถูกยับยั้งได้ด้วย 10 mM EDTA, 1.25 mg/ml LPS หรือ 2.5 mg/ml laminarin

6. โปรตีน LGBP บริสุทธิ์จากกุ้งขาวสามารถจับกับแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ได้ดีในสภาวะที่มี Ca^{2+} มากกว่าในสภาวะที่ไม่มี Ca^{2+}

7. จากการโคลนยีนพบว่า full-length cDNA ของยีน LGBP ของกุ้งขาว ประกอบด้วย 1,282 คู่เบส ที่มี 1 open reading frame (1,101 คู่เบส) ซึ่ง encode สายเปปไทด์ยาว 367 amino acid มีมวลโมเลกุล 41.6 kDa ยีน LGBP ของกุ้งขาวมีความเหมือนกับของกุ้งแชบ๊วยมากที่สุด (95%)

8. ยีน LGBP มีการแสดงออกมากสุดในตับ พบน้อยกว่าในหัวใจและเหงือก

9. จากการบ่มตับของกุ้งขาวด้วย *V. parahaemolyticus* เมื่อวัดการแสดงออกของ mRNA ของยีน LGBP ด้วยวิธี semiquantative RT- PCR ในช่วงเวลา 0 - 4 ชั่วโมง พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นตามเวลาตั้งแต่ 0.5 ชั่วโมง และเพิ่มสูงสุดที่ 2.5 - 3 ชั่วโมง หลังการบ่ม จากนั้นมีค่าลดลง

10. จากการบ่มตับของกุ้งขาวด้วย WSSV พบการแสดงออกของ mRNA ของยีน LGBP เพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 1 ชั่วโมง หลังการบ่ม จากนั้นมีค่าลดลง

11. งานวิจัยเหล่านี้บ่งชี้ว่ายีนและโปรตีน LGBP ซึ่งเป็น PRP ชนิดหนึ่ง มีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว ซึ่งเป็นกลไกการป้องกันตนเองที่ตอบสนองต่อเชื้อก่อโรคกุ้ง ซึ่งควรมีการศึกษากลไกอย่างละเอียดต่อไป

เอกสารอ้างอิง

วิไลพร ธรรมรัตน์. 2551. การศึกษาเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในกุ้งแชบ๊วย. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

อารีรัตน์ เชาว์สมบรูณ์, อรณิชา รัตนาภรณ์ และประภาพร อุทารพันธุ์. 2556. การโคลนยีนและสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์ของโปรตีนจับลิโพโพลีแซคคาไรด์และเบตา-1,3-กลูแคนจากกุ้งแชบ๊วย. การประชุมวิชาการระดับชาติสวนดุสิต: วันนักวิทยาศาสตร์ 2013, มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต, กรุงเทพฯ, ประเทศไทย.

Amparyup, P., Sutthangkul, J., Charoensaapsri, W. and Tassanakajon, A. 2012. Pattern Recognition Protein Binds to Lipopolysaccharide and β-1,3-Glucan and Activates Shrimp Prophenoloxidase System. J. Biol. Chem. 287, 10060-10069.

Aspan, A., Huang, T.S., Cerenius, L. and Söderhäll, K. 1995. cDNA cloning of prophenol-oxidase from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* and its activation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 192, 939-943.

Aspan, A. and Söderhäll, K. 1991. Purification of prophenoloxidase from crayfish blood cells, and its activation by an endogenous serine proteinase. Insect biochemistry 21, 363-373.

Auttarat, J., Phiriyangkul, P. and Utarabhand, P. 2006. Characterization of vitellin from the ovaries of the banana shrimp *Litopenaeus merguiensis*. Comp. Biochem. Physiol. 143B, 27-236.

Barracco, M.A., Duvic, B. and Söderhäll, K. 1991. Cell Tiss. Res. 266, 491-497.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quatities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

Cheng, W., Liu, C.H., Tsai, C.H. and Chen, J.C. 2005. Molecular cloning and characterization of a pattern recognition molecules, lipopolysaccharide- and β-1,3-glucan binding protein (LGBP) from the white shrimp Litopenaeus vannamei. Fish Shellfish Immunol. 18, 297-310.

Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis: II. Method and application to human serum protein. Annals of the New York Academy of Sciences 121, 404-427.

Du, X.J., Wang, J.X., Liu, N., Zhao, X.F., Li, F.H. and Xiang, J.H. 2006. Identification and molecular characterization of a peritrophin-like protein form Fleshy prawn (*Fenneropenaeus chinensis*). Mol. Immunol. 43, 1633-1644.

Du, X.-J., Zhao, X.-F. and Wang, J.-X. 2007. Molecular cloning and characterization of a lipopolysaccharide and β-1,3-glucan binding protein (LGBP) from fleshy prawn (*Fenneropenaeus chinensis*). Mol. Immunol. 44, 1085-1094.

Duvic, B. and Söderhäll, K. 1990. Purification and characterization of β-1,3-glucan binding protein from the plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. J. Biol. Chem. 265, 9332-9337.

Goncalves, P., Vernal, J., Rosa, R.D., Yepiz-Plascencia, G., De Souza, C.R., Barracco, M.A. and Perazzolo L.M. 2012. Evidence for a novel biological role for the multifunctional β-1,3-glucan binding protein in shrimp. Mol. Immunol. 51, 363-367.

Johansson, M.W., Lind, M., Holmblad, T., Thornqvist, P.O. and Söderhäll, K., 1995. Peroxinectin, a novel cell adhesion protein from crayfish blood. Biochem. Biophys. Res. Commun. 216, 1079-1087.

Kim, Y.S., Ryu, J.H., Han, S.J., Choi, K.H., Nam, K.B., Jang, I.H., Lemaitre, B., Brey, P.T. and Lee, W.J. 2000. Gram-negative bacteria-binding protein, a pattern recognition receptor for lipopolysaccharide and β-1,3-glucan protein that mediates the signaling for the induction of innate immune gene in *Drosophila melanogaster* cells. J. Biol. Chem. 275, 32721-32727.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure protein during as sembly of head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

Lee, S.Y., Wang, R. and Söderhäll, K. 2000. A lipopolysaccharide- and β-1,3-glucan-binding protein from hemocytes of the freshwater crayfish *Pacifas-tacus leninusculus*. Purification, characterization, and cDNA cloning. J. Biol. Chem. 275, 1337-1343.

Lee, W.J., Lee, J.D., Kravchenko, V.V., Ulevitch, R.J. and Brey, P.T. 1996. Purification and molecular cloning of an inducible Gram-negative bacteria-binding protein from the silkworm, *Bombyx mori*. Immunology 93, 7888-7893.

Lin, Y.C., Vaseeharan, B. and Chen, L.C. 2008. Identification and phylogenetic analysis on lipopolysaccharide and β-1,3-glucan-binding protein of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicas*. Dev. Comp. Immunol. 32, 1260-1269.

Ma, C. and Kanost, M.R. 2000. A beta1,3-glucan recognition protein from an insect, *Manduca sexta*, agglutinates microorganisms and activates the phenoloxidase cascade. J. Biol. Chem. 11, 7505-7514.

Medzhitov, R. and Janeway, Jr., C.A. 1997. Innate immunity: the virtues of a non-clonal system of recognition. Cell 91, 295.

Rattanaporn, O. 2010. Molecular cloning and characterization of lectin and lipopolysaccharide and β-1,3-glucan binding protein genes from banana shrimp, *Fenneropenaeus merguiensis*. Ph.D. Thesis in Biochemistry, Prince of Songkla University.

Rattanaporn, O. and Utarabhand, P. 2011. Molecular cloning of a C-type lectin with two CRD domains from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguiensis*: Early gene up-regulation after *Vibrio harveyi* infection. J. Invertebr. Pathol. 106, 196-204.

Rittidach, W., Paijit, N. and Utarabhand, P. 2007. Purification and characterization of a lectin from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguiensis* hemolymph. Biochim. Biophys. Acta 1770, 106–114

Roux, M.M., Pain, A., Klimper, K.R. and Dhar, A.Y. 2002. The lipopolysaccharide and β-1,3-glucan binding protein gene is upregulated in white spot virus-infected shrimp (*Penaeus stylirostris*). J. Virol. 76, 7140-7149.

Siva, V.S., Yang, C., Yang J., Wang, L., Wang, L., Zhou, Z., Qiu, L. and Song, L. 2012. Association of CfLGBP gene polymorphism with disease susceptibility/resistance of Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) to *Listonella anguillarum*. Fish Shellfish Immunol. 32, 1117-1123.

Söderhäll, K. 1982. Prophenoloxidase activating system and melanization: A recognition mechanism of arthropods? Dev. Comp. Immunol. 6, 601-611.

Söderhäll, K. and Ajaxon, R. 1982. Effect of quinones and melanin on mycelial growth of Aphanomyces spp. and extracellular protease of *Aphanomyces astaci*, a parasite on crayfish. J. Invert. Pathol. 39, 105–109.

Söderhäll, K. and Cerenius, L. 1992. Crustacean Immunity. Annu. Rev. of Fish Dis. 2, 3-23.

Söderhäll, K. and Cerenius, L. 1998. Role of the prophenoloxidase activating system in invertebrate immunity. Curr. Opin. Immunol. 10, 23-28.

Sritunyalucksana, K., Wongsuebsantati, K., Johansson, M.W. and Söderhäll, K. 2001. Peroxinectin, a cell adhesive protein associated with the ProPO system from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Dev. Comp. Immunol. 25, 353-356.

Sritunyalucksana, K., Lee, S.Y. and Söderhäll, K. 2002. A β-1,3-glucan binding protein from black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Dev. Comp. Immunol. 26, 237-245.

Thornqvist, P.-O., Johansson, M. W. and Söderhäll, K. 1994. Opsonic activity of cell adhesion proteins and β-1,3-glucan binding proteins from two crustaceans. Develop. Comp. Immunol. 18, 3-12.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 4350-4354.

Utarabhand, P., Rittidach, W. and Paijit, N. 2007. Bacterial agglutination by sialic acid-specific lectin in the hemolymph of the banana shrimp, *Penaeus (Ferneropenaeus) merquiensis*. Science Asia 33, 41-46.

Vargas-Albores, F., Jimenez-Vega, F. and Söderhäll, K. 1996. A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) which enhances the activation of prophenol-oxidase system by β-1,3-glucan. Dev. Comp. Immunol. 5, 299-306.

Valli, J.S. and Vaseeharan,B. 2012. cDNA cloning, characterization and expression of lipopolysaccharide and β-1,3-glucan binding protein (LGBP) gene from the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. Comp. Biochem. Physiol. 163A, 74–81.

Yang, J., Qiu, L., Wang, L., Wei, X., Zhang, H., Zhan, Y., Liu, L. and Song, L. 2010. A pattern recognition receptor in *Chlamys farreri* involved in the immune response against various bacteria. Fish Shellfish Immunol. 29, 825-831.

Yeh, M.S., Chang, C.C. and Cheng, W. 2009. Molecular cloning and characterization of lipopolysaccharide- and β-1,3-glucan-binding protein from the giant freshwater prawn Macrobrachium rosenbergii and its transcription in relation to foreign material injection and the molt stage. Fish Shellfish Immunol. 27, 701–706.

Zhang, X.-W., Xu, W.-T., Wang, X.-W., Mu, Y., Zhao, X.-F., Yu, X.-Q., Wang, J.-X. 2009. A novel C-type lectin with two CRD domains from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* functions as a pattern recognition protein. Mol. Immunol. 46, 1626–1637.

Zhao, D., Chen, L., Qin, C., Zhang, H., Wu, P., Li, Erchao., Chen, L. and Qin, J. 2009. Molecular cloning and characterization of the lipopolysaccharide and β-1, 3 glucan binding protein in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). Comp. Biochem. Physiol. 154B, 17–24.