

การโคลนและศึกษาสมบัติของยีนเลคตินสองชนิด (เลคตินแบบ C  
และเลคตินที่มีโดเมนไฟบริโนเจน) จากฮีโมไซต์ของกุ้งพีนีส  
ที่ตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อก่อโรค

Cloning and characterization of two lectin genes (C-type lectin  
and fibrinogen domain containing lectin) from hemocytes of  
*Penaeus* shrimp in response to pathogenic challenge

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทาร์พันธุ์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

รายงานฉบับสมบูรณ์  
ที่ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณคณะวิทยาศาสตร์  
ประจำปี 2558-2559

## บทคัดย่อ

ในการศึกษานี้ ได้โคลนยีนเลคตินแบบ C เรียก FmLC5 จากฮีโมไซท์ของกุ้งแชบ๊วย cDNA สายเต็มของยีนนี้ประกอบด้วย 1,526 คู่เบส มีหนึ่ง open reading frame (ORF) ซึ่งแปลงเป็นเปปไทด์ที่มี 284 กรดอะมิโน มีหนึ่ง signal peptide มีมวลโมเลกุล 31.47 kDa และค่า pi เป็น 4.35 โครงสร้างปฐมภูมิของ FmLC5 ประกอบด้วย 2 CRD (carbohydrate recognition domains) ที่คล้ายกัน ซึ่งแต่ละ CRD มี 1 Ca<sup>2+</sup> binding site และ 1 QPD motif ซึ่งจำเพาะต่อการจับกับ galactose รวมทั้งจัดตัวเป็นแบบ double-loop ที่ยึดกันด้วย 2 disulfide bonds พบการแสดงออกของ FmLC5 เฉพาะในเซลล์ฮีโมไซท์เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี RT-PCR และ *in situ* hybridization การแสดงออกของ FmLC5 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ 12 และ 18 ชั่วโมง หลังการเหนี่ยวนำด้วย *Vibrio harveyi* และ white spot syndrome virus (WSSV) ตามลำดับ รวมทั้งจากการฉีดด้วย lipopolysaccharide (LPS) ผลการวิจัยเหล่านี้สรุปได้ว่า FmLC5 เป็นเลคตินชนิดใหม่ที่จับกับ galactose ซึ่งมีบทบาทเป็นตัวรับในระบบภูมิคุ้มกันเพื่อป้องกันกุ้งจากเชื้อก่อโรคแบคทีเรียและไวรัส

นอกจากนี้ ได้โคลนยีนเลคติน LFd ที่มีโดเมนคล้ายไฟบริโนเจน (FBG) จากฮีโมไซท์ของกุ้งแชบ๊วย โครงสร้างปฐมภูมิของ LFd มีหนึ่ง signal peptide หนึ่ง FBG domain หนึ่ง Ca<sup>2+</sup> binding site และมีมวลโมเลกุล 34.9 kDa พบการแสดงออกของ LFd ในหลายเนื้อเยื่อ พบมากสุดในกระเพาะ แต่พบน้อยมากในฮีโมไซท์ การแสดงออกของ LFd ในกระเพาะเพิ่มอย่างมากเมื่อเหนี่ยวนำด้วย *V. harveyi* และ WSSV โปรตีนลูกผสมของยีน LFd (rLFd) บริสุทธิ์กระตุ้นการเกาะกลุ่มของแบคทีเรีย โดยการเกาะกลุ่มถูกยับยั้งได้ด้วย LPS และ lipoteichoic acid (LTA) rLFd ยังสามารถจับกับแบคทีเรียเหล่านี้และจับกับ LPS และ LTA ได้ จากผลการวิจัยบ่งชี้ว่าเลคติน LFd เกี่ยวข้องในการตอบสนองของกุ้งต่อเชื้อก่อโรคที่บุกรุก

## Abstract

In this study, a new C-type lectin gene designated as FmLC5 was isolated from hemocytes of *Fenneropenaeus merguensis*. Its full-length cDNA is composed of 1,526 bp with a single open reading frame (ORF) of 852 bp, encoded a peptide of 284 residues. The primary sequence of FmLC5 comprises a signal peptide of 20 amino acids with a molecular mass of 31.47 kDa and pI of 4.35. The primary structure of FmLC5 consists of 2 similar carbohydrate recognition domains (CRDs), each CRD contains a  $\text{Ca}^{2+}$  binding site and a QPD motif specific for galactose-binding and displays a double-loop characteristic stabilized by 2 conserved disulfide bonds. The FmLC5 transcripts were detected only in the hemocytes analyzed by RT-PCR and *in situ* hybridization. After challenge with *Vibrio harveyi* or white spot syndrome virus (WSSV), the FmLC5 expression was significantly up-regulated to the maximum at 12 or 18 h for *V. harveyi* or WSSV inoculation, respectively. Its expression was also induced by lipopolysaccharide (LPS) injection. These results conclude that FmLC5 is a new putative galactose-binding C-type lectin in *F. merguensis* that contributes as receptors in the immune response to defend the shrimp from pathogenic bacteria and viruses.

Otherwise, another lectin containing fibrinogen-like (FBG) domain, named LFD, was cloned from *F. merguensis* hemocytes. Its primary sequence comprised a signal peptide (18 amino acids), a FBG domain, one  $\text{Ca}^{2+}$  binding site and a molecular mass of 34.9 kDa. The expression of LFD was found in many tissues, mainly in stomach but slightly in hemocytes. Its expression in stomach was particularly up-regulated upon challenge with *V. harveyi* or WSSV. Purified recombinant LFD (rLFD) showed the agglutinating activity towards bacteria which could be inhibited by LPS and lipoteichoic acid (LTA). It could also bind to the same species of tested bacteria and both LPS including LTA. Altogether, these findings indicated that this kind of lectin might participate in shrimp immune defense against pathogenic invaders.

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “การโคลนและศึกษาสมบัติของยีนเลคตินสองชนิด (เลคตินแบบ C และ เลคตินที่มีโดเมนไฟบริโนเจน) จากฮีโมไซท์ของกุ้งฝอยที่ตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อก่อโรค” นี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2558-2559 ผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เป็นอย่างสูง ที่ได้อนุญาตให้ใช้สถานที่วางถังน้ำทะเลเพื่อเลี้ยง กุ้งในการทดลอง และขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้เอื้อเฟื้อเครื่องมือต่าง ๆ เพื่อให้งานวิจัยดำเนินลุล่วงไปด้วยดี ผลงานวิจัยนี้อยู่ในระหว่างการเตรียมต้นฉบับเพื่อตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ งานวิจัยนี้ขออุทิศแด่สัตว์ทดลองทุกชีวิต

ประภาพร อูทาร์พันธุ์

## คำนำ

รายงานฉบับสมบูรณ์ฉบับร่างนี้ เป็นการศึกษาเลคตินสองชนิดที่มีโครงสร้างแตกต่างกัน จึงแบ่งรายงานเป็นสองบท สำหรับเลคตินแต่ละชนิด ดังนี้

บทที่ 1 เป็นการศึกษาเลคตินแบบ C (ในที่นี้เรียกว่า FmLC5) จากฮีโมไซท์ของกุ้งแชบ๊วยที่ตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อก่อโรค โดยเสนอเป็นต้นฉบับที่รอการตีพิมพ์โดยอยู่ในระหว่าง under review ของวารสาร เมื่อได้ตอบรับการตีพิมพ์แล้วจะใส่ในรายงานฉบับสมบูรณ์ในรูปแบบต้นฉบับที่ได้ตีพิมพ์แล้ว

บทที่ 2 เป็นการศึกษาเลคตินที่มีโดเมนไฟบริโนเจน (LFd) โดยขอรายงานผลการวิจัยแบบสรุปและไม่วิจารณ์ผล เพื่อลดการเผยแพร่ข้อมูลผลงานวิจัย เพราะกำลังเตรียมต้นฉบับตีพิมพ์ ซึ่งยังไม่ได้ส่งไปยังวารสาร

ตามที่เขียนในวัตถุประสงค์ว่าจะศึกษาผลการเหนี่ยวนำด้วยไวรัส WSSV ต่อการแสดงออกของยีน LC และยีน LFd ในฮีโมไซท์ของกุ้งขาว เปรียบเทียบผลกับของกุ้งแชบ๊วย พบว่าจากผลการบ่มเซลล์ฮีโมไซท์กุ้งขาวด้วยไวรัส WSSV พบการแสดงออกของยีน LC และยีน LFd ในฮีโมไซท์กุ้งขาวน้อยมากและไม่มีนัยสำคัญของความแตกต่าง ณ เวลาต่าง ๆ จึงไม่ได้แสดงผลในส่วนนี้ไว้ เพราะไม่มีประโยชน์ในด้านข้อมูล

เนื่องจากยีนในบทที่สองที่เขียนในรายงานฉบับนี้ยังไม่ได้ตีพิมพ์เผยแพร่ จึงขอไม่ให้เผยแพร่ข้อมูลในรายงานนี้ทั้งหมด จนกว่าต้นฉบับของเรื่องที่สองได้รับการตีพิมพ์เรียบร้อยแล้วเพื่อลด plagiarism ของข้อมูลที่อาจเกิดขึ้นได้ในขณะส่งต้นฉบับไปตีพิมพ์ ทั้งนี้เมื่อผลงานได้รับการตีพิมพ์แล้วจะส่งตามมาภายหลัง

## สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	2
Abstract	3
กิตติกรรมประกาศ	4
คำนำ	5
สารบัญเรื่อง	6
บทนำ	7
วัตถุประสงค์	9
บทที่ 1 เลคตินแบบ C (FmLC5)	10
บทที่ 2 เลคตินที่มีโดเมนไฟบริโนเจน (LFd)	20
วัตถุประสงค์	20
วิธีดำเนินการวิจัย	20
ผลการวิจัย	25
เอกสารอ้างอิง	26

## บทนำ

การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลเป็นอุตสาหกรรมที่สำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย เพราะสามารถทำรายได้อย่างมากให้แก่ประเทศ ประเทศไทยมีการพัฒนาเทคนิควิธีการเพาะเลี้ยงกุ้งในระบบหนาแน่นได้ กุ้งที่นิยมเพาะเลี้ยงในประเทศไทยในขณะนี้คือ กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ซึ่งเข้ามาแทนที่กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ที่มีการติดเชื้อง่ายโรคจนทำให้ผลผลิตลดลงอย่างมาก แต่ข้อดีของกุ้งขาวคือต้องนำเข้าพ่อแม่พันธุ์จากต่างประเทศ มีขนาดเล็กกว่ากุ้งกุลาดำ แม้โตเร็ว แต่มีราคาสูงกว่าและรสชาติดีกว่า กุ้งกุลาดำ จากการที่กุ้งขาวไม่ใช่กุ้งท้องถิ่นของไทย มีโอกาสติดโรคระบาดได้ง่าย ขณะนี้มีรายงานการตายอย่างเร่งด่วนของกุ้งขาวที่เพาะเลี้ยง กุ้งแชบ๊วย (*Fenneropenaeus merguensis*) ซึ่งเป็นกุ้งท้องถิ่นของไทย อาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้ง เนื่องจากมีข้อได้เปรียบเรื่องต้นทุนการผลิตสูง เพราะกุ้งแชบ๊วยที่เลี้ยงในบ่อดินสามารถเจริญพันธุ์เพื่อใช้ในการผลิตกุ้งได้ (สุพจน์ จึงแย้มปิ่น และชัยรัตน์ พุ่มช่วย, 2543) แต่การเลี้ยงกุ้งในระบบหนาแน่นมักส่งผลกระทบต่อสุขภาพทำให้การเจริญเติบโตลดลง เกิดความเครียดอ่อนแอ และสามารถติดโรคได้ง่าย แบคทีเรียสายพันธุ์หลักที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งในประเทศไทยคือ *Vibrio* spp. โดยเฉพาะเชื้อ *Vibrio harveyi* เมื่อกุ้งได้รับเชื้อนี้จะเกิดเป็นโรคเรืองแสงและตายในที่สุด รวมทั้งยังมีไวรัสที่แพร่ระบาดโดยทำให้กุ้งเกิดโรคคือโรคตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus, WSSV) ปัจจุบันโรคระบาดของกุ้งก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก การศึกษาโปรตีนที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองจากเชื้อก่อโรคกุ้งจึงมีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงกุ้ง

กุ้งเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่มครัสเตเชียน (crustacean) มีระบบไหลเวียนเลือดที่เรียกว่าฮีโมลิมฟ์ (hemolymph) เป็นแบบเปิด มีระบบกลไกการป้องกันตนเองที่เรียกว่า innate immune system เพื่อป้องกันสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุก กลไกการป้องกันตนเองของกุ้งอาศัยระบบภูมิคุ้มกันสองแบบ ได้แก่ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (cellular immunity) ซึ่งอาศัยการทำงานของเม็ดเลือด หรือเซลล์ฮีโมไซท์ (hemocyte) ได้แก่กระบวนการกลืนกิน (phagocytosis) การเกิดโนดูล (nodule formation) และการกักล้อม (encapsulation) จุลินทรีย์ (microorganism) ที่บุกรุก เป็นต้น ครัสเตเชียนยังมีระบบภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (humoral immunity) ที่ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด (Söderhäll and Cerenius, 1998) บางชนิดยังไม่ได้มีการศึกษา เนื่องจากในสภาวะปกติจะมีปริมาณน้อยมาก โดยโปรตีนเหล่านี้จะถูกหลั่งออกมาซึ่งพบว่ามีปริมาณเพิ่มขึ้นในฮีโมลิมฟ์เมื่อสัตว์เกิดการติดเชื้อหรือถูกกระตุ้น ระบบภูมิคุ้มกันที่เป็นสารน้ำถูกกระตุ้นได้โดยเบตา-1,3-กลูแคน ( $\beta$ -1,3-glucan) หรือ lipopolysaccharide (LPS) บนผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ ดังนั้นโปรตีนที่จดจำ LPS, peptidoglycan หรือเบตา-1,3-กลูแคน จึงถูกเรียกว่า pattern recognition receptors (PRRs) (Medzhitov and Janeway, 1997) ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวข้องในระบบป้องกันตนเองทั้งในสัตว์มีและไม่มีกระดูกสันหลัง PRRs มีหลายชนิด อาทิระบบโปรเฟโนลออกซิเดส (prophenoloxidase) ซึ่งถูกกระตุ้นโดย LPS จากแบคทีเรีย หรือเบตา-1,3-กลูแคนจากแบคทีเรียหรือ fungi การจับระหว่างองค์ประกอบผิวเซลล์เหล่านี้กับ PRRs นำไปสู่การกระตุ้นให้เกิด opsonin หรือ degranulation ของเซลล์เม็ดเลือดในกุ้งนาง

(crayfish) (Barracco *et al.*, 1991) ทำให้มีการหลั่งระบบโปรตีนออกซิเดส ซึ่งเปลี่ยนไปเป็นเอนไซม์ ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase) ที่เป็นเอนไซม์ในวิถีการสังเคราะห์เมลานิน (melanin) ซึ่งไปยับยั้งการ เจริญของจุลินทรีย์บุกรุกต่อไป (Söderhäll and Cerenius, 1998)

เลคติน (lectin) เป็น PRR ชนิดหนึ่งที่มีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกันของ crustacean เลคตินเป็นโปรตีน ที่จับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรตบนผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ เช่นเบตา-1,3-กลูแคน หรือ LPS ทำให้เซลล์เกิดการเกาะกลุ่ม (agglutination) เพื่อช่วยกำจัดการบุกรุกของจุลินทรีย์ มีรายงานการศึกษาเลคตินที่พบในฮีโม ลิมพ์ของกุ้งหลายชนิด ส่วนมากมีความจำเพาะต่อน้ำตาลที่มีหมู่เอ็น-อะซีทิล (N-acetyl group) โดยเฉพาะ น้ำตาลกรดไซอะลิก (sialic acid) เช่นมีการพบเลคตินจากซีรัม (serum) ของกุ้งกุลาดำที่ทำให้แบคทีเรียก่อ โรคในกุ้งกุลาดำเกาะกลุ่มได้ (Ratanapo and Chulavatnatol, 1992) จากการศึกษาของผู้วิจัยและคณะพบเล คตินที่จำเพาะต่อกรดไซอะลิก (sialic acid-specific lectin, LSA) ในฮีโมลิมพ์ของกุ้งแชบ๊วยมีแอกทิวิตี (activity) เพิ่มสูงขึ้นตอบสนองต่อการติดเชื้อมากกว่า *V. harveyi* และเลคติน LSA บริสุทธิ์ของกุ้งแชบ๊วย สามารถทำให้แบคทีเรียก่อโรคงูเกิดการเกาะกลุ่ม แต่ไม่มีผลต่อแบคทีเรียไม่ก่อโรคงู แสดงถึงบทบาทที่ เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันของเลคติน (Utarabhand *et al.*, 2007; Rittidach *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังพบว่า ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของเลคติน LSA บริสุทธิ์คล้ายกับโดเมนไฟบริโนเจน (fibrinogen domain) ของ เลคตินฟิโคลิน (ficolin) ของคนซึ่งมีโดเมนไฟบริโนเจนเป็นองค์ประกอบ แม้มีการศึกษาในระดับโมเลกุลของ โปรตีนเลคติน LSA ของกุ้งหลายชนิด แต่ยังไม่เคยมีรายงานการโคลนยีนเลคติน LSA ได้สำเร็จ รวมทั้งผู้วิจัย เอง ทำให้ไม่มีข้อมูลระดับยีนของเลคติน LSA มีเพียงรายงานการศึกษาเบื้องต้นของยีนเลคตินที่มีโดเมนไฟบริ โนเจน (fibrinogen domain containing lectin) จากแมงดาทะเล (horseshoe crab *Tachypleus tridentatus*) โดยเรียกว่า TLs-5 ซึ่ง Gokudan และคณะ (1999) ได้ทำให้เลคติน TLs-5 บริสุทธิ์จากฮีโมลิมพ์ พบว่ามี 2 form คือ TLs-5a และ TLs-5b ซึ่งแยกได้เลคติน TLs-5 บริสุทธิ์ ปริมาณ 3-4 มิลลิกรัม จากพลาสมา 500 มิลลิลิตร และเมื่อศึกษาด้วยวิธี Western blot พบ TLs-5a ในตับ หัวใจ และลำไส้ ในขณะที่พบ TLs-5b เฉพาะในฮีโมไซท์ (Gokudan *et al.*, 1999) ขณะนี้ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาเลคตินที่มีโดเมนไฟบริโนเจน ในกุ้งชนิดใด และจะเห็นว่าการศึกษาระดับยีนทำได้ง่ายกว่าการศึกษาระดับโปรตีนของเลคตินบริสุทธิ์ โครงการวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษายีนเลคตินที่มีโดเมนไฟบริโนเจนจากฮีโมไซท์และผลิตโปรตีนลูกผสมของเล คตินดังกล่าวเพื่อศึกษาบทบาทระดับโปรตีนของเลคตินชนิดนี้ในกุ้งแชบ๊วย นอกจากนี้ ปัจจุบันยีนเลคตินที่มี รายงานการศึกษาในกุ้งหลายชนิดส่วนใหญ่เป็นเลคตินแบบ C (C-type lectin) ซึ่งมีตำแหน่งจับ  $Ca^{2+}$  ( $Ca^{2+}$  binding motif) แต่ไม่มีโดเมนไฟบริโนเจนเป็นองค์ประกอบ และโคลนได้จากเนื้อเยื่อตับเป็นหลัก เช่นเดียวกับ ของกุ้งแชบ๊วย (Utarabhand *et al.*, 2017) ยีนเลคตินเหล่านี้มีการแสดงออกตอบสนองต่อการติดเชื้อมากกว่า กุ้ง มีเพียงรายงานในกุ้งขาวจีน (*Fenneropenaeus chinensis*) เท่านั้นที่พบยีนเลคตินแบบ C ในเซลล์ฮีโม ไซท์ (Liu *et al.*, 2007) โครงการวิจัยนี้จึงสนใจที่จะโคลนยีนเลคตินแบบ C จากเซลล์ฮีโมไซท์ของกุ้งแชบ๊วย ด้วย เพื่อศึกษาบทบาทที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของเลคตินชนิดนี้เปรียบเทียบกับยีนเลคตินแบบ C ที่เคย โคลนได้จากตับของกุ้งชนิดเดียวกัน



เนื่องจากกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวที่นิยมเพาะเลี้ยงเกิดโรคระบาดอย่างมาก กุ้งแชบ๊วยอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการเพาะเลี้ยง เพราะเป็นกุ้งท้องถิ่นของไทย โดยผู้วิจัยได้ศึกษาบทบาทของโปรตีน PRRs ในสารน้ำหลายชนิดที่มีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งแชบ๊วยซึ่งตอบสนองต่อการติดเชื้อก่อโรคกุ้ง อาทิ เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และโปรตีนจับลิโพโพลีแซคคาไรด์และเบตา-1,3-กลูแคน (LGBP) (Chaosomboon *et al.*, 2017) ที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อก่อโรคในกุ้งแชบ๊วย รวมทั้งเลคติน L<sub>Sa</sub> และยีนเลคตินแบบ C เพื่อทำงานวิจัยเกี่ยวกับภูมิคุ้มกันในกุ้งแชบ๊วยครบสมบูรณ์ในกุ้งชนิดเดียวกัน โครงการวิจัยนี้จึงสนใจที่จะใช้กุ้งแชบ๊วยเป็นตัวอย่างหลักในการศึกษา โดยมีจุดประสงค์ที่จะศึกษาโมเลกุลระดับโปรตีนและยีนของเลคตินสองชนิดที่มีโครงสร้างที่ต่างกันคือเลคตินแบบ C และเลคตินที่มีโดเมนไฟบริโนเจน ซึ่งมีรายงานการพบในเซลล์เม็ดเลือด ตลอดจนการโคลนยีนของเลคตินสองชนิดนี้จากเซลล์ฮีโมไซท์ของกุ้งแชบ๊วย เพื่อเปรียบเทียบบทบาทที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของเลคตินทั้งสองชนิดที่มีโครงสร้างที่ต่างกัน และเปรียบเทียบบทบาทของเลคตินที่มีแหล่งการแสดงออกที่ต่างกันคือในเซลล์ฮีโมไซท์และในตับหรือฮีโมลิมพ์ที่เคยศึกษามาก่อน (Thepnarong *et al.*, 2015; Rittidach *et al.*, 2007) รวมทั้งศึกษาการตอบสนองของยีนเลคตินเหล่านี้ต่อการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อก่อโรค *V. harveyi* และ WSSV ในกุ้งแชบ๊วย และจะลงศึกษาในกุ้งขาวเพื่อนำองค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษากลไกการป้องกันตนเองในกุ้งแชบ๊วย ไปใช้กับกุ้งขาวได้ด้วย โดยไม่ทำให้องค์ความรู้ที่ศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งแชบ๊วยที่ได้ทำมาอย่างต่อเนื่องในกุ้งชนิดเดียวกันเสียเปล่า และความรู้ที่ได้จะทำให้เข้าใจบทบาทของเลคตินในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งมากขึ้น ซึ่งจะเป็นข้อมูลวิจัยส่วนหนึ่งนำไปสู่การเรียนรู้กลไกการป้องกันตนเองในกุ้งแบบอาศัยเซลล์ (cellular immunity) ว่ามีความเชื่อมโยงหรือแตกต่างจากภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (humoral immunity) ทั้งนี้เพราะมักพบว่าโปรตีนต่าง ๆ ในสิ่งมีชีวิตมีการทำงานร่วมหรือเชื่อมโยงกัน ผลการวิจัยที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้งานวิจัยที่ศึกษาในกุ้งแชบ๊วยกับการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวต่อไปในอนาคต

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสร้าง cDNA สายเต็มของยีนเลคตินแบบ C (LC ซึ่งในรายงานเรียก FmLC5) จากเซลล์ฮีโมไซท์ของกุ้งแชบ๊วย และศึกษาสมบัติของยีน LC
2. เพื่อสร้าง cDNA สายเต็มของยีนเลคตินที่มีโดเมนไฟบริโนเจน (LFd) จากเซลล์ฮีโมไซท์ของกุ้งแชบ๊วย และศึกษาสมบัติของยีน LFd
3. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน LC และยีน LFd ในเนื้อเยื่อของกุ้งแชบ๊วย
4. เพื่อศึกษาผลการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อก่อโรคกุ้งต่อการแสดงออกของยีน LC และยีน LFd ในกุ้งแชบ๊วย
5. เพื่อสร้างโพรบของยีน LC และยีน LFd ของกุ้งขาว และศึกษาผลการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อก่อโรคต่อการแสดงออกของยีน LC และยีน LFd ในฮีโมไซท์ของกุ้งขาว เปรียบเทียบผลกับของกุ้งแชบ๊วย
6. เพื่อสังเคราะห์รีคอมมิแนนท์โปรตีนของเลคติน (Recombinant lectin, rLFd) จากยีน LFd
7. เพื่อทำให้เลคติน rLFd บริสุทธิ์ และศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของเลคติน rLFd บริสุทธิ์

บทที่ 1  
เลขคตินแบบ C (FmLC5)



# FmLC5, a putative galactose-binding C-type lectin with two QPD motifs from the hemocytes of *Fenneropenaeus merguensis* participates in shrimp immune defense

Wilaiwan Senghoi, Phanthipha Runsaeng, Prapaporn Utarabhand\*

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand

## ARTICLE INFO

### Keywords:

*Fenneropenaeus merguensis*  
QPD motif  
Dual-CRD lectin  
RNAi  
*In situ* hybridization  
Innate immunity

## ABSTRACT

Crustaceans are deficient in adaptive immune system. They depend completely on an innate immunity to protect themselves from invading microorganisms. One kind of pattern recognition receptors that contribute roles in the innate immunity is lectin. A new C-type lectin gene designated as FmLC5 was isolated from *Fenneropenaeus merguensis*. Its full-length cDNA is composed of 1526 bp and one open reading frame of 852 bp encoding a peptide of 284 amino acids. The deduced amino acid sequence of FmLC5 comprises a signal peptide of 20 contiguous amino acids with a molecular mass of 31.47 kDa and an isoelectric point of 4.35. The primary structure of FmLC5 consists of two similar carbohydrate recognition domains (CRDs), each CRD contains a Ca<sup>2+</sup> binding site-2 and a QPD motif specific for galactose-binding. The FmLC5 transcripts were detected only in the hemocytes analyzed by RT-PCR and *in situ* hybridization. The FmLC5 expression was significantly up-regulated after challenge with *Vibrio harveyi*, white spot syndrome virus (WSSV) or lipopolysaccharide. RNAi-based silencing with co-injection by *V. harveyi* or WSSV resulted in critical suppression of the FmLC5 expression, increasing in mortality and reduction of the median lethal time. These results conclude that FmLC5 is unique putative galactose-binding C-type lectin in *F. merguensis* that may contribute as receptor molecule in the immune response to defend the shrimp from pathogenic bacteria and viruses.

## 1. Introduction

Invertebrates do not have an adaptive immunity or immunological memory. Crustaceans including shrimp depend only on an innate immune system that comprises cellular and humoral immunity to defend themselves against foreign materials (Hoffmann et al., 1999; Beutler, 2004). The innate immune system refers to germline encoded factors for recognition and elimination of invading microorganisms by phagocytosis. Recently, it was considered to be specific and capable of discriminating between self and non-self (Jiravanichpaisal et al., 2006). Both humoral and cellular defenses exhibit coordination to maintain and to protect animals themselves from disease agents since many humoral factors affect hemocyte function while hemocytes are an essential source of many humoral molecules (Elrod-Erickson et al., 2000; Lavine and Strand, 2002). Circulating hemocytes are primary cells of different types which participate in removal of invading microorganisms by phagocytosis, hemocyte aggregation or nodule formation, encapsulation of large molecules and triggering cytotoxic reactions (Wang and Wang, 2013a, 2013b; Tassanakajon et al., 2013). Recognition of foreign invaders through pattern recognition receptors (PRRs) is an

initial action of the innate immunity. PRRs recognize carbohydrate on the microbial cell surface which is so-called pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) (Janeway and Medzhitov, 2002). Lectins, either free in the hemolymph or associated with the hemocytes, may act as both recognizers and effectors of immunity (Rowley and Powell, 2007). Several PRRs including lectins have been increasingly identified in crustaceans. One of the important shrimp PRRs is C-type lectins which refer to the large family of calcium-dependent carbohydrate binding proteins. The superfamily of C-type lectins is subdivided into subtypes relying on similarities in their structures and functional differences. Most reported shrimp C-type lectins contain one or two carbohydrate recognition domains (CRDs). Most CRDs have a conservative EPN (Glu-Pro-Asn) or QPD (Gln-Pro-Asp) motif in Ca<sup>2+</sup> binding site-2 for specific mannose or galactose binding, respectively (Drickamer, 1992, 1993; Kolatkar and Weis, 1996). Although C-type lectins that contain a single CRD is a common configuration, most shrimp C-type lectins consist of 2 CRDs for instance FcLectin, FcLec2 and FcLec5 from *Fenneropenaeus chinensis* (Xu et al., 2010; Liu et al., 2007; Zhang et al., 2009), LvLT and LvCTL1 from *Litopenaeus vannamei* (Zhao et al., 2009; Ma et al., 2007), PmLT from *Penaeus monodon* (Ma et al., 2008), and

\* Corresponding author.

E-mail address: [prapaporn.u@psu.ac.th](mailto:prapaporn.u@psu.ac.th) (P. Utarabhand).

FmLC from *Fenneropenaeus merguensis* (Rattanaporn and Utarabhand, 2011). The increasing diversity of shrimp C-type lectins has been reported to have divergent functions being involved in the immune recognition and numerous biological phenomena such as mediating pathogen recognition and cellular interactions (Yang et al., 2011; Luo et al., 2006; Wang et al., 2013; Utarabhand et al., 2017b), prophenoloxidase activation (Junkunlo et al., 2012; Yu et al., 1999), and induction of antibacterial and antiviral activity (Sun et al., 2008; Wang et al., 2009a, 2009b; Zhao et al., 2009; Li et al., 2014). Recently, MjHeCL that was identified from the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* inhibited bacterial proliferation by regulating the expression of antimicrobial peptides (Wang et al., 2014). Most lectin genes appear to be expressed mainly in an important hepatopancreatic tissue (Zhang et al., 2009; Wang et al., 2014; Rattanaporn and Utarabhand, 2011; Thepnarong et al., 2015; Utarabhand et al., 2017b), some are found in non-hepatopancreatic tissues like stomach and gills (Junkunlo et al., 2012; Runsaeng et al., 2015). Hemocytes are not only accountable for phagocytosis, encapsulation and nodule formation, but they also function as the source of effectively soluble recognition receptors such as lectins (Liu et al., 2007; Wang and Wang, 2013a; Wang et al., 2014). The only one dual-CRD C-type lectin, *F. chinensis* FcLectin, was reported to express specifically in the hemocytes and up-regulated after challenge with either bacteria or white spot syndrome virus (WSSV) (Liu et al., 2007).

We previously reported the characterization and functional analysis of four C-type lectins so-called FmLCs from *F. merguensis*, an importantly economic species in Thailand. We demonstrated that FmLC which consisted of two CRDs with QPD and EPN motifs, was expressed only in the hepatopancreas (Rattanaporn and Utarabhand, 2011) similar to FmLC1 that contained a single CRD with EPS motif (Thepnarong et al., 2015). Two single-CRD lectins with a QPD motif were recently isolated, FmLC2 was exhibited mainly in the stomach and gills (Runsaeng et al., 2015) while FmLC4 was found only in the hepatopancreas (Utarabhand et al., 2017b). Moreover, a sialic acid-specific FmL, the purified lectin from *F. merguensis* hemolymph, had been recently characterized and presumably involved in maturation of the ovaries (Utarabhand et al., 2017a). FmL induced hemagglutinating activity and selective agglutination in Ca<sup>2+</sup>-dependent manner of pathogenic bacteria and these were soundly suppressed by sialic acid and fetuin (Rittidach et al., 2007). These lectins are proven to be participated in shrimp innate immune responses towards *Vibrio harveyi*, one of the shrimp pathogenic bacteria in Thailand. Hereby, we aimed to investigate a diverse C-type lectin (called FmLC5) that exhibited its expression or action in hemocytes by using *In situ* hybridization, artificial pathogenic challenging and gene silencing approaches. All of these studies would suggest the action of this lectin in shrimp immune defense.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Shrimp and hemocyte preparation

*F. merguensis* shrimp (15–20 g in body weight) were purchased from the commercial farm in Nakhon Si Thammarat province of southern Thailand. Shrimp fed with food pellets were reared in aerated tanks, 1 ml of hemolymph was drawn from the pericardial sinus with a syringe with a 21 gauge needle and mixed with an equal volume of anticoagulant solution (Gollas-Galván et al., 1999). The hemocytes were pelleted by centrifugation at 800g for 15 min at 4 °C. Then, the supernatant was discarded and the pellet was kept at –80 °C until use.

### 2.2. Total RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was prepared from shrimp hemocytes using TriPure isolation reagent (Roche Diagnostics, Germany). The quantity of total RNA was assessed by measuring the absorbance at 260 nm (A260)

using MeastroNano spectrophotometer (Meastrogen, USA) whereas its purity was confirmed by the ratio of A260/A280. One microgram of total RNA was treated with DNase I. The DNA-free RNA was reverse transcribed to first-strand cDNA by SuperScript III Reverse Transcriptase and oligo(dT)<sub>12-18</sub> primer (Invitrogen, USA) following the manufacturer's protocol. Then, it was served as a cDNA template to clone the DNA fragment of FmLC5 by polymerase chain reaction (PCR) technique.

### 2.3. Cloning of FmLC5 cDNA

To clone a dual-CRD lectin containing two QPD motifs from *F. merguensis*, named FmLC5, an internal cDNA fragment was produced by using primers designed relying on the CRD conserved domain of C-type lectins which comprising QPD motif from *F. merguensis* (FmLC2) and other crustacean species present in GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

An internal FmLC5 cDNA was amplified by PCR using forward FmLC5-F1 and reverse FmLC5-R1 primers (Table S1). The PCR condition was carried out in a Mastercycler (Eppendorf, Germany), in a 25 µl final volume consisting of 1 × GoTaq Flexi reaction buffer, 0.2 µM FmLC5-F1, 0.2 µM FmLC5-R1, 80 µM dNTP mix, 0.5 µl of first strand cDNA, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 4 unit/ml of GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega, USA). The amplified program was initiated at 94 °C for 5 min to denature the cDNA template following 35 cycles of 94 °C for 30 s, 52 °C for 45 s and 72 °C for 1 min. At the last cycle, PCR products were incubated for 5 min at 72 °C and visualized by electrophoresis staining with ethidium bromide. The Gel/PCR DNA fragment extraction kit (Geneaid, Taiwan) was used to purify DNA from the gel. Then, the target PCR fragment was introduced into the pGEM-T Easy cloning vector, and transformed into *Escherichia coli* DH5α. Inserted plasmids consisting of FmLC5 from each clone were nucleotide sequenced using T7 and SP6 universal primers and sequencing kit (Applied Biosystems, USA).

### 2.4. Production of a complete cDNA sequence

FmLC5-F2 and FmLC5-R2 primers were synthesized from the internal sequence of FmLC5 cDNA. The nucleotide sequences of 5' and 3' missing ends were produced by rapid amplification of cDNA end (RACE) method using first strand cDNA generated from *F. merguensis* hemocytes and the GeneRacer kit (Invitrogen) according to instructions of company. The amplified DNA was monitored by 1% agarose gel electrophoresis, isolated from the gel, attached to pGEM-T Easy cloning vector and subjected to DNA sequencing. A complete nucleotide sequence of FmLC5 was constructed by overlapping of three fragments. In order to confirm the complete nucleotide sequence of FmLC5, new gene specific primers (FmLC5-F3 and FmLC5-R3, Table S1) were produced relying on the full-length cDNA sequence and used to amplify an open reading frame (ORF) by RT-PCR. Similarly, isolated total RNA from hemocytes was served to construct the first-strand cDNA in PCR amplification. The PCR products were performed and subjected to DNA sequencing.

### 2.5. Sequence comparison and phylogenetic analysis

The ExpASY server (<https://www.expasy.org/tools/>) was used to analyze the primary sequence of FmLC5. SignalP 3.0 program (Bendtsen et al., 2004) was applied to estimate the presence of signal peptide. NetNGlyc 1.0 was chosen to predict the potential N-glycosylation sites. The simple modular architecture research tool (SMART) was utilized to investigate the protein motif features. SWISS-MODEL prediction algorithm was used to construct the tertiary structural modelling that was shown by DeepView/Swiss-Pdb Viewer version 4.1.0.

In order to analyze the translated amino acid sequences of several

lectins containing QPD motif in CRDs domain from shrimp (*F. merguensis* FmLC and FmLC5, *F. chinensis* FcLectin, FcLec2 and FcLec5, *P. monodon* PmLT, *Penaeus semisulcatus* PsLT, and *L. vannamei* LvLT) and from a freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*, Mrlec1), the sequence comparison was built by multiple-alignments using the Clustal W program (Thompson et al., 1994). The phylogenetic tree was established by MEGA 5.2 (Tamura et al., 2011) relying on the overall amino acid alignment of dual CRD sequences consisting of QP\* motif present in Genbank. Those chosen lectins obtained from the shrimp *F. merguensis* (FmLC, FmLC5), *P. monodon* (PmLT), *L. vannamei* (LvLT, LvCTL-br1, LvCTL-br2), *P. semisulcatus* (PsCTL), *F. chinensis* (FcLectin, FcLec2, FcLec5), prawn *M. rosenbergii* (Mrlec1), and from insects *Bombyx mori* (BmLELS-1, BmLELS-2) and *Helicoverpa armigera* (Halectin). The reproducibility of the results was evaluated by one thousand bootstraps.

## 2.6. Expression of FmLC5 mRNA in different tissues

Various tissues (stomach, heart, muscle, lymphoid organ, intestine, and hepatopancreas) including hemocytes were carefully removed from *F. merguensis*. After total RNA extraction by TriPure isolation reagent (Roche), contaminated DNA was discarded with DNase I (Invitrogen). One microgram of DNA-treated RNA was treated with oligo(dT)<sub>12-18</sub> primer to produce first-strand cDNA as described in method Section 2.4. Two 18S rRNA primers (Table S1) were used to amplify *F. merguensis* 18S rRNA by RT-PCR and its product was used as a control.

## 2.7. Transcription of FmLC5 mRNA upon challenge with WSSV and *V. harveyi*

*V. harveyi* was cultured in a tryptic soy agar (TSA) containing 2% NaCl following the procedure previously reported (Rittidach et al., 2007). WSSV was extracted from infected shrimp tissues by being homogenized in K-199 medium. After centrifugation at 9300g for 10 min at 4 °C, the supernatant was collected and filtered through 0.2 µm filter to obtain the WSSV stock. For LD<sub>50</sub> test, the viral stock of ten-fold serial dilution was injected into the shrimp. The cumulative mortality was recorded for ten days. The concentration of viral stock resulted in shrimp mortality for 50% in 7 days was dilution to be 10<sup>-7</sup> of stock. Hence, this concentration was selected to challenge shrimp in all experiments.

In the treated experiment, individual shrimp was injected with 100 µl saline solution (0.85% NaCl) containing WSSV (10<sup>-6</sup> of stock) or *V. harveyi* (5 × 10<sup>8</sup> cells/ml) into the abdominal muscle located at the sixth abdominal segment. In the control group, shrimp was directly injected with 100 µl saline solution. Each experiment was performed in duplicate at 25–26 °C. The hemolymph was drawn from individual shrimp (n = 5–7) from each treatment at various time points after stimulation including 0, 6, 12, 18, 24, 48 and 72 h. The hemocytes were collected and used to isolate total RNA following the method previously described in Sections 2.1 and 2.2. FmLC5 gene expression was determined by quantitative RT-PCR (qRT-PCR) using StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems) following the method previously reported (Thepnarong et al., 2015; Phiriyangkul et al., 2007).

The ABI-Primer Express program version 3.01 was used for primer and probe designing. For FmLC5, primers and probe were chosen from an internal fragment of FmLC5 cDNA (GenBank # KU297216). Probe and primers of 18S rRNA were designed based on the partial nucleotide sequence previously reported (GenBank # DQ501247). The probe and primer sets were selected with concerning of for optimal melting temperatures, secondary structure, base composition, and amplicon lengths. Each set of primers and FAM-labeled TaqMan probe were synthesized for using in qRT-PCR. The qRT-PCR reaction was established in a final volume of 20 µl reaction mixture containing 10 µl of 2 × TaqMan Universal PCR Master Mix (Taq Gold DNA polymerase, AmpErase UNG, dNTP with dUTP, ROX™ Passive Reference dye)

(Applied Biosystems), 900 nM of each primer, 250 nM probe and 1 µl of cDNA template. The reaction was initiated at 50 °C for 2 min to optimize activity of UDG enzyme, 95 °C for 10 min to activate the AmpliTaq gold DNA polymerase and following 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min.

FmLC5 or 18S rRNA gene was inserted into the pGEM-T Easy vector with the same condition as previously described in method Section 2.3. The plasmids were used as material for construction of a standard curve of the target gene (FmLC5) or the reference gene (18S rRNA). The curve was linear over five to six orders of magnitude, with the linear correlation between the threshold cycles and the target gene levels being over 0.99. Then, it was used to calculate the quantities of sample mRNA. The relative abundance of FmLC5 transcript calibrated against that of the internal control (18S rRNA) was used to normalize FmLC5 mRNA transcription in the tissue at different times after challenge. All data were analyzed with one-way ANOVA using Duncan's multiple comparison test. Differences between treatments and controls were considered significant at *p* values < 0.05.

## 2.8. Double stranded RNA (dsRNA) synthesis of FmLC5 gene

An internal FmLC5-DNA fragment (488 bp) was synthesized following the method described in Section 2.3 to construct the recombinant plasmids which were used as template for double-stranded RNA (dsRNA) production. The primers, FmLC5T7-F and FmLC5T7-R (Table S1) were then utilized to synthesize FmLC5 fragment consisting of nucleotide sequence for T7 promoter at the 5'-terminus. Sense and antisense RNA strands were generated by *in vitro* transcription using T7 RiboMAX™ express large scale RNA production systems (Promega). After DNA template digestion, standard phenol-chloroform extraction was used to purify dsRNA. In order to maximize yield of duplex, the prepared dsRNA was incubated at 70 °C for 15 min and cool down to room temperature for at least 25 min. The dsRNA quality was observed by agarose gel electrophoresis and its quantity was determined by measuring A<sub>260</sub>. A pBS-lacZ vector, GFP-F/R and GFP7-F/R primers were used for a green fluorescent protein (GFP) gene amplification. Afterwards, dsRNA of GFP was also injected into shrimp for a negative dsRNA control.

## 2.9. Silencing of FmLC5 gene by dsRNA and cumulative mortality assay

In order to investigate the effect of dsRNA on silencing FmLC5 expression in *F. merguensis*, juvenile shrimp (3 g) were separated into 6 groups (n = 13 for each group). For RNA interference (RNAi) experiments, shrimp was individually injected with saline solution comprising FmLC5 dsRNA or GFP dsRNA (2.5 µg each dsRNA/g shrimp). Shrimp in the control group were administered with saline solution. At 24 h post-inoculation, each shrimp was injected again by saline solution with or without dsRNA which mixed with WSSV (10<sup>-7</sup> of stock) or *V. harveyi* (2 × 10<sup>5</sup> cells). Then, the hemolymph was drawn from each shrimp (n = 3 from each group) at 48 h or 24 h for co-injection with WSSV or bacterium, respectively. The FmLC5 transcription in the silencing or reference groups was verified by semi-quantitative RT-PCR analysis. The remained shrimp (n = 10 from each group) were cultured further and counted for the cumulative mortality rate after secondary injection.

## 2.10. Separation of the hemocytes and *in situ* hybridization

The hemolymph (0.5 ml) was drawn freshly from *F. merguensis* and different types of hemocyte populations were separated through 70% Percoll gradient centrifugation (Sigma, USA) (Söderhäll and Smith, 1983). Briefly, Percoll density gradient was performed by centrifugation at 25,000g for 20 min at 4 °C before hemocyte separation. The hemolymph was mixed 1:1 with an anticoagulant, layered immediately on the top of the Percoll gradient and then centrifuged at 2,900g for 10 min at 4 °C. Afterwards, the bands containing each type of the

hemocytes were carefully collected by pipetting. The morphology and characterization of each cell type were microscopically observed after hematoxylin and eosin staining. Cell viability was analyzed by trypan blue exclusion. The separated hemocytes were subjected to *in situ* hybridization.

To prepare RNA probes, digoxigenin (DIG)-labeled oligonucleotides (Roche) for antisense and sense probes to internal nucleotide sequence of FmLC5 (GenBank # KU297216) were synthesized using the MEGAscript RNA synthesis kit (Invitrogen). The hemocytes were collected and fixed onto Poly-L-lysine coated slides with fixative solution (10% formalin in 1.5% saline solution) at 4 °C. They were washed with diethylpyrocarbonate (DEPC) treated PBS (10 mM phosphate buffered saline, pH 7.4) and then digested with 10 µg/ml proteinase K (Invitrogen) in PBS for 10 min at 37 °C. After washing with PBS, slides were refixed in fixative solution containing 5 mM MgCl<sub>2</sub> for 10 min at room temperature. Thereafter, they were washed with PBS and pre-hybridized with hybridization buffer (50% formamide, 5 × SCC, 100 µg/ml ssDNA from salmon testis, 0.1% Tween-20 and 100 µg/ml heparin in PBS) for 2 h at 50 °C. Each slide was then hybridized with either DIG-labeled sense or antisense FmLC5 cRNA probe at 50 °C overnight in a moist chamber. In the washing step, the hemocytes were incubated in 0.2 × SSC at 60 °C for 1 h, and subsequently washed with 0.2 × SSC at room temperature for 5 min. The hybridized DIG-labeled probe was detected with anti-DIG alkaline phosphatase conjugate and visualized with colorimetric substrate NBT/BCIP (Roche). The slides were mounted in 90% glycerol and then observed under a light microscope.

### 3. Results

#### 3.1. Molecular characterization and primary sequence of FmLC5

A full-length nucleotide sequence of FmLC5 was constructed from 3 overlapping clones of an internal and 5' and 3' cDNA fragments synthesized from total RNA of *F. merguensis* hemocytes. The amplified ORF sequence was confirmed an identity of the reconstructed sequence. The entire nucleotide and amino acid sequences of FmLC5 were deposited in GenBank # KU297216 and # ANE31673, respectively. The full-length FmLC5 cDNA contained 1526 bp, one 5' UTR (untranslated region) of 87 bp and one 3' UTR (587 bp) (Fig. S1). It was composed of an ORF (852 bp) encoded 284 amino acid residues. The primary sequence of FmLC5 was composed of a signal peptide of 20 amino acids, a peptide with molecular mass of 31.47 kDa and pI of 4.35. Using SMART program, FmLC5 comprised two similar CRD domains. CRD1 (residues 32–154) was composed of a QPD (Gln<sup>119</sup>-Pro<sup>120</sup>-Asp<sup>121</sup>) motif and one Ca<sup>2+</sup> binding site-2, ND (Asn<sup>141</sup>-Asp<sup>142</sup>), while CRD2 (residues 159–281) also consisted of one QPD (Gln<sup>246</sup>-Pro<sup>247</sup>-Asp<sup>248</sup>) motif and a Ca<sup>2+</sup> binding site-2, ND (Asn<sup>268</sup>-Asp<sup>269</sup>). Moreover, FmLC5 has four disulfide bridges bonded by 8 cysteine residues (60 and 153, 129 and 145, 187 and 280, 256 and 272) (Fig. S1). The ExPASy proteomics analysis predicted four O-linked glycosylation sites at Ser<sup>25</sup>, Ser<sup>116</sup>, Thr<sup>175</sup> and Ser<sup>243</sup> without N-linked glycosylation site in FmLC5.

The potential tertiary structure of FmLC5 was generated according to the template 5a6C-type mannose receptor from *Homo sapiens* by SWISS-MODEL program (Fig. 1). FmLC5 structure was composed of 4 α-helices and 15 β-strands which adopted 2 double-loop structures containing 2 regions. An upper region consisting of 10 β-strands and Ca<sup>2+</sup> binding sites-2 (Ca<sup>2+</sup>-2) contributed in the binding of carbohydrate were found in the long loop region. A lower region comprised 4 α-helices and 5 β-strands. Eight conserved cysteines (C1 and C4, C2 and C3, C5 and C8, C6 and C7) were noted to form four disulfide linkages at the bases of the loops in both CRDs.

#### 3.2. Comparison of FmLC5 primary sequence to other C-type lectins

The primary sequences of two CRDs each of which contained one

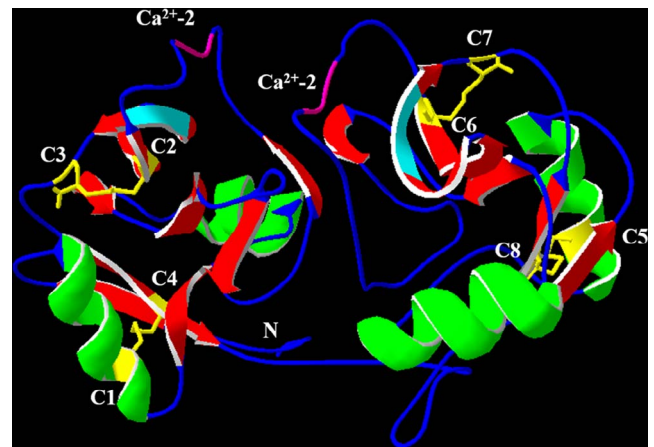


Fig. 1. Potential tertiary structure of dual CRDs of FmLC5 predicted by SWISS-MODEL program. Navy-blue, random coils; red, β-strands; green, α-helices; sky-blue and pink, Ca<sup>2+</sup>-2 binding sites; and yellow, disulfide bonds. C1-C8 represents eight cysteines involved in forming four disulfide bonds. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

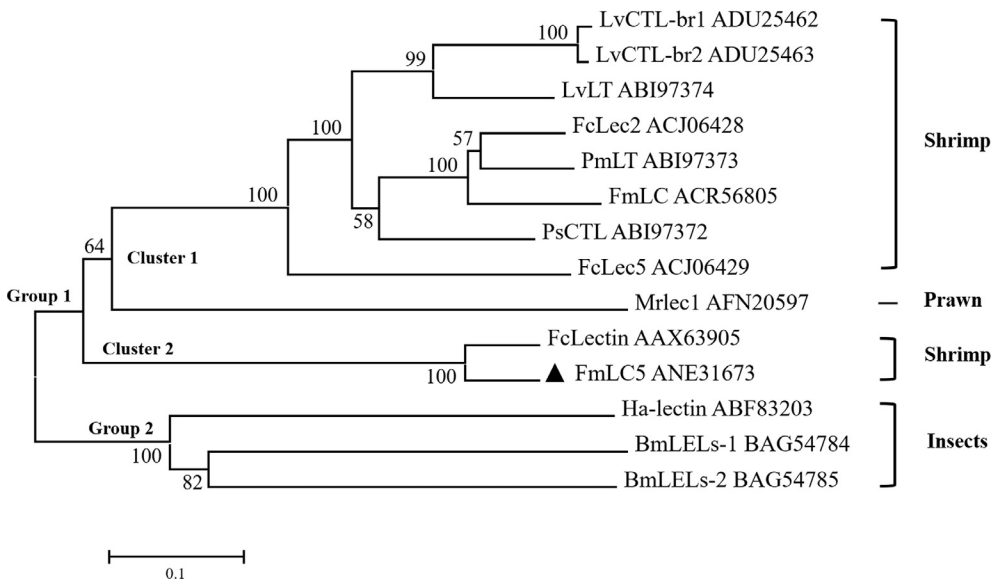
QPD motif of FmLC5 (GenBank # ANE31673) and of other dual-CRD lectins obtained from six species were multiple-aligned (Fig. S2). Four highly conserved cysteines were located in each CRD of these lectins. A QPD motif was shown in CRD1 of all lectins included FmLC5 while another QPD motif was found in the CRD2 of only FmLC5 and FcLectin (Fig. S2). The overall sequence of FmLC5 shared the highest similarity (94% identity) to the sequence of dual-CRD FcLectin of *F. chinensis*. Low similarity (38–45% identity) was observed to dual-CRD lectins of other species including FmLC (46% identity). When the FmLC5 primary sequences of between the CRD1 and CRD2 were compared, it showed a high 86% identity. Besides, the CRDs of FmLC5 was least similar to that of single-CRD FmLC2 (44%) and FmLC4 (GenBank # AGS42195) (47%), suggesting that FmLC5 was a new lectin found in *F. merguensis*.

A phylogenetic tree generated from the whole primary sequence analysis of CRDs comprising QPD motifs of FmLC5 and other dual-CRD C-type lectins from freshwater prawn, shrimp and insects was shown in Fig. 2. The tree illustrated 2 groups. Group 1 consisting of shrimp and prawn lectins was divided into 2 clusters. Cluster 1 comprised dual-CRD lectins contained one QPD motif of shrimp whereas the freshwater prawn Mrlec1 was out of cluster 1. The FmLC5 and FcLectin of *F. chinensis* were presented in cluster 2 and closely related. Another group included the dual-CRD lectins from insects (BmLELs1, BmLELs2 and Halectin).

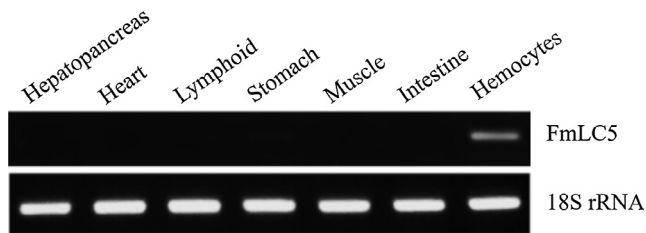
#### 3.3. Expression of FmLC5 in different tissues and in the hemocytes after injection with *V. harveyi*, WSSV or LPS

The mRNA expression of FmLC5 in various tissues of normal shrimp was observed by RT-PCR and using 18S rRNA as an internal control. The FmLC5 transcripts were detected only in the hemocytes, none was found in other tissues of normal shrimp (Fig. 3).

Otherwise, the time-course FmLC5 expression in the hemocytes of shrimp given with the pathogenic *V. harveyi* or WSSV was investigated by qRT-PCR whereas 18S rRNA was used as an internal standard. No significant differences were detected in the FmLC5 transcript levels in the control throughout the experimental period (Fig. 4). Upon challenge with *V. harveyi*, the FmLC5 expression in the shrimp hemocytes increased at 6 hpi (hour post-injection) from an original level (0 h) to reach the highest level at 12 hpi, decreased at 18 hpi and then raised to get a peak at 24 hpi. Thereafter, the expression of FmLC5 decreased gradually at 48–72 hpi (Fig. 4A). After being given with WSSV, the expression of FmLC5 in the hemocytes increased from 6 hpi to get a maximum at 18 hpi. After that, it declined from 24 to 72 hpi (Fig. 4B). With similar pattern, Fig. 4C shows that the FmLC5 expression was



**Fig. 2.** Phylogenetic analysis of mature proteins from FmLC5 and other animal C-type lectins. The tree was established by the neighbor-joining method monitored by MEGA 5.2 with a bootstrap of 1000 corresponding to the amino acid alignments of sequences from selected lectins from five species of shrimp, prawn and two insects as follows; LvCTL-br1, LvCTL-br2 and LvLT, *Litopenaeus vannamei*; FcLec2, FcLec5 and FcLectin, *Fenneropenaeus chinensis*; PmLT, *Penaeus monodon*; FmLC and FmLC5, *Fenneropenaeus merguensis*; PsCTL, *Penaeus semisulcatus*; Mrlec1, *Macrobrachium rosenbergii*; Ha-lectin, *Helicoverpa armigera*; BmLELs-1 and BmLELs-2, *Bombyx mori*. GenBank accession numbers of each lectin are presented in the figure. Arrow indicates the FmLC5 while the bar (0.1) shows the genetic distance.



**Fig. 3.** RT-PCR analysis of FmLC5 mRNA expression in different tissues. Total RNA was extracted from various tissues including hemocytes. RT-PCR products were amplified by using the primers specific to the FmLC5 gene and 18S rRNA. RT-PCR of 18S rRNA transcript was done as an internal control.

particularly induced to increase to peak at 24 h post LPS injection, suggested that either *V. harveyi* or bacterial cell component LPS could induced FmLC5 expression.

### 3.4. Expression of FmLC5 and cumulative mortality upon dsRNA injection

To demonstrate a contribution of FmLC5 in the immune response of *F. merguensis*, gene silencing conducted by RNA interference was carried out to investigate FmLC5 expression in the knockdown animals. The FmLC5 expression was suppressed by 95% in hemocytes of shrimp co-injected with *V. harveyi* or WSSV after the second injection with FmLC5 dsRNA (Fig. 5). In the control groups, the mRNA expression of FmLC5 was not affected by GFP dsRNA or saline injection (Fig. 5). The silencing was speculated to be gene-specific because only its mRNA expression was critically discouraged by FmLC5 dsRNA.

In the same treatments, the FmLC5 silenced shrimp with *V. harveyi* co-injection revealed a cumulative mortality of 20% in 12 h and up to 80% and 100% in 24 h and 48 h post-second injection, respectively (Fig. 6A). The cumulative mortality with WSSV co-injection was 50% in 24 h and 100% in 72 h (day 3) (Fig. 6B). The cumulative mortality of the control groups given with GFP dsRNA or saline showed similar patterns, those were 30% in day 2 and 50% in day 4–6 with *V. harveyi* co-injection, while 30% in day 3 as well as 50% in day 5–6 by WSSV co-inoculation.

### 3.5. Separation of the hemocytes and localization by in situ hybridization

The circulating hemocytes were separated by 70% Percoll centrifugation into three distinct separated bands. Each isolated hemocyte band was picked up to investigate cell morphology under a light

microscope after hemotoxylin and eosin staining (Fig. 7). Three types of hemocytes were found and defined relying on different size and number of granules in the cytoplasm. Hyaline cells lack granules whereas semi-granular cells contain some cytoplasm granules. Granular cells are larger than hyaline and semi-granular cells, and they contain the most granules.

FmLC5 mRNA was detected in the hemocytes using DIG-labelled probes. The FmLC5 mRNA transcripts were detected as positive signals with antisense probe in granular and semi-granular cells, none (negative signal) in hyaline cells. The negative control hybridized with sense probe showed no signal in all three types of hemocyte cells (Fig. 7).

## 4. Discussion

In invertebrates, C-type lectins were known to contain at least one CRD with  $\text{Ca}^{2+}$  binding site-2 that contributed in carbohydrate binding activity (Zelensky and Gready, 2005). The CRD found in crustaceans is composed of a QPD or an EPN motif that is necessary for binding of galactose or mannose, respectively (Drickamer, 1992, 1993; Kolatkar and Weis, 1996). In this report, FmLC5 cloned from the hemocytes of *F. merguensis* was revealed to be dual-CRD C-type lectin as its structure fitted well with the characteristic of common C-type lectins. It was composed of two similar CRDs sharing 86% identity with each other which was similar to that of *F. chinensis* FcLectin (Liu et al., 2007). FmLC5 has two QPD motifs located in each CRD, suggesting that it is a putative galactose-binding lectin and may have more affinity for the galactose binding than one QPD motif containing lectins like FmLC, FmLC4, LvLT, FcLec5 and PmLT (Drickamer, 1992; Kolatkar and Weis, 1996; Rattanaporn and Utarabhand, 2011; Utarabhand et al., 2017b; Ma et al., 2007, 2008; Xu et al., 2010). The primary sequence of FmLC5 was closely similar to that of FcLectin from the bioinformatics analyses. It shared low identity to FmLC, FmLC2 and FmLC4, indicated that FmLC5 is unique in *F. merguensis*.

Crustacean hemocytes are well known in capable of sequestering and eliminating invading pathogens. They contribute important roles in the crustacean immunity and also to synthesize and secrete some PRR molecules (Smith and Chisholm, 1992; Wang and Wang, 2013a, 2013b; Tassanakajon et al., 2013). By RT-PCR analysis, FmLC5 mRNA was found to express only in the hemocytes of normal shrimp. In corresponding well with *in situ* hybridization, the positive signals were detected in semi-granular and granular hemocytes, none was found in hyaline cells. Likewise, FcLectin, the highest similar structure to FmLC5, was also expressed mainly in the hemocytes of *F. chinensis* as

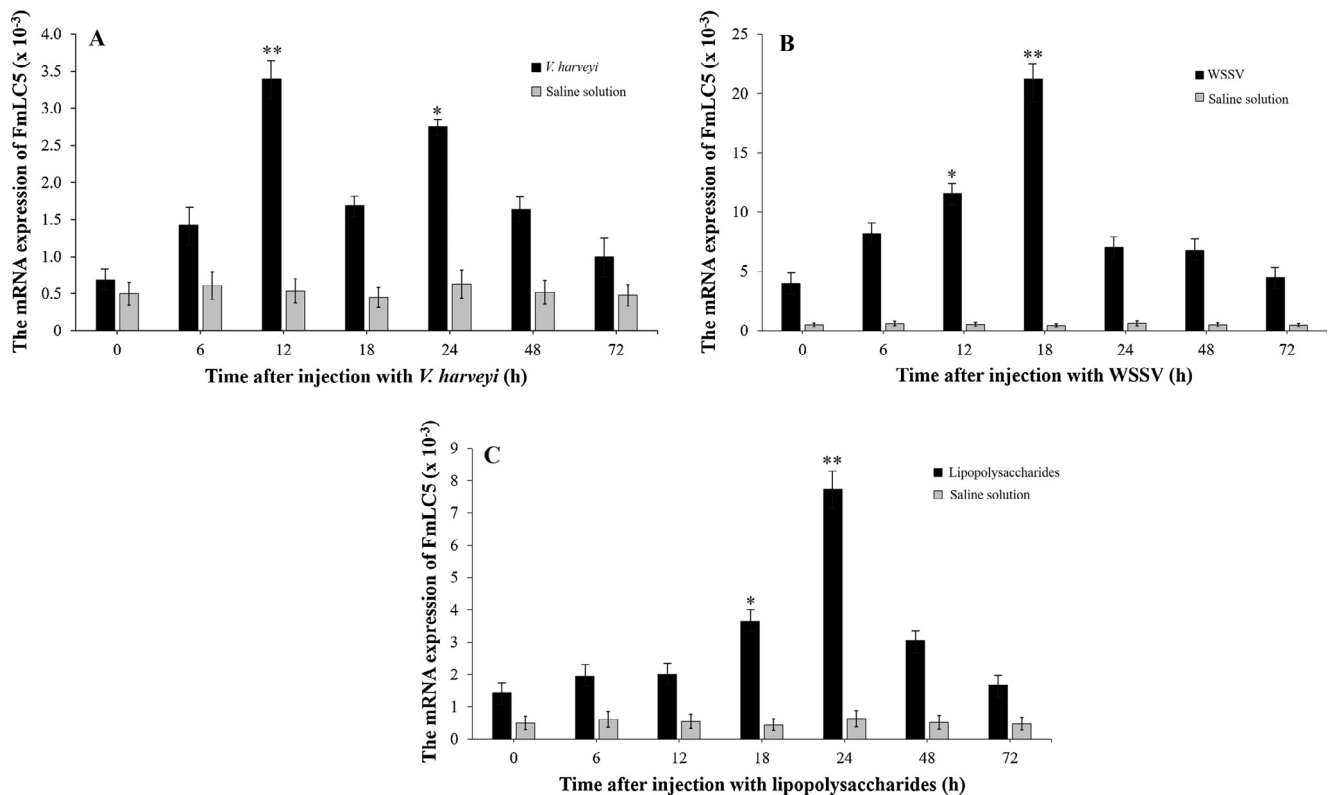


Fig. 4. FmLC5 expression in the hemocytes at different time intervals in response to *V. harveyi* (A), WSSV (B) and LPS challenge (C). Time-course expression of FmLC5 in the hemocytes of shrimp challenged by *V. harveyi*, WSSV or LPS and saline injection was quantified by qRT-PCR using 18S rRNA as an internal standard. Bars represent standard errors of mean values. Asterisks indicate significant differences (\**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01).

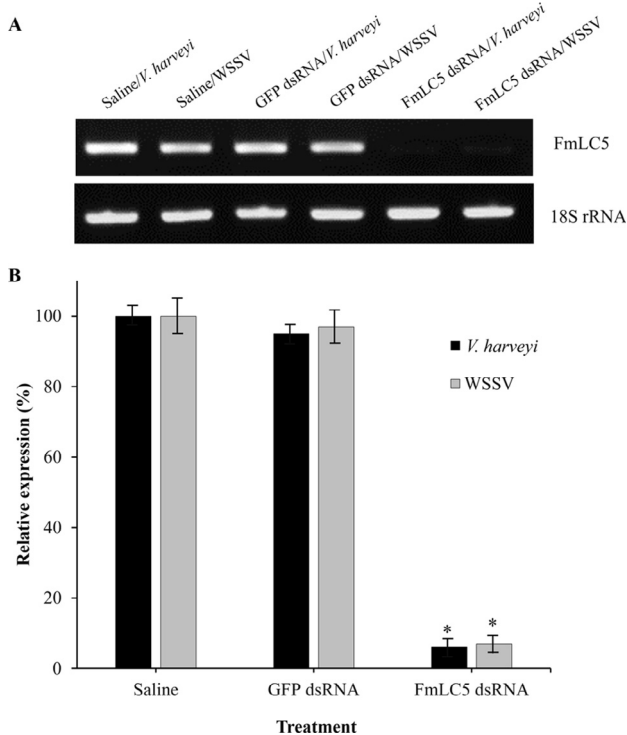


Fig. 5. FmLC5 expression in the hemocytes of the silenced *F. merguensis*. Shrimp (n = 3) were injected twice with dsRNA and followed by *V. harveyi* or WSSV inoculation. Controls were injected with GFP dsRNA or saline in a similar manner. FmLC5 expression was verified by 1% agarose gel electrophoresis (A) and semi-quantitative RT-PCR (B) using 18S rRNA as an internal standard. Bars represent standard errors of mean values. Asterisks indicate significant differences (\**p* < 0.01).

detected by Northern blotting and *in situ* hybridization (Liu et al., 2007).

*V. harveyi* is considered to be a violent pathogen caused shrimp vibriosis in Thailand. In the artificially infectious experiments by *V. harveyi*, the significant increase of FmLC5 expression in the hemocytes at 12 hpi was specifically influenced by bacterial stimulation. It was not caused by injection since the FmLC5 expression level was not changed in control shrimp during 0–72 hpi. FcLectin gene also displayed similar response against *Vibrio* and *Staphylococcus* challenge (Liu et al., 2007), except it did not split into two peaks like FmLC5 did. The similar expression pattern that split into 2 peaks was found for EsCTL of *Eriocheir sinensis* in response to *Vibrio anguillarum* challenge, MrLec3 or MrLec4 of the freshwater prawn *M. rosenbergii* in response to *V. parahaemolyticus* or *V. anguillarum* challenge, respectively (Wang et al., 2013; Ren et al., 2012), without any explanation was mentioned in those reports. We postulated that this event might be the second immune response of FmLC5 as also reported for FcLec3 of *F. chinensis* challenged with WSSV (Wang et al., 2009a). In contrast, FmLC5 gene in the hemocytes was *in vivo* induced to get one peak at 24 hpi upon injection of *F. merguensis* with LPS, main components on the cell surface of Gram-negative bacteria. Nevertheless, diverse saccharides might be found on *V. harveyi* cell surface. FmLC5 might respond towards *V. harveyi* by binding with other saccharide moieties in the first peak and bind to LPS on the bacterial surface in the second peak. Thus, the response of FmLC5 to *V. harveyi* and LPS stimulation occurred at the same time point of 24 hpi. In addition, one of the most serious viral diseases for shrimp cultivation worldwide was caused by WSSV. We demonstrated that FmLC5 was significantly up-regulated after WSSV inoculation in the hemocytes in a similar manner as of FcLectin (Liu et al., 2007). Despite the recombinant protein of FmLC5 was not produced in this report, we found that recombinant protein of FmLC4 of the same species could agglutinate and bind directly to bacteria and yeast with Ca<sup>2+</sup> dependence, also bind to LPS, lipoteichoic acid and β-1,3-glucan



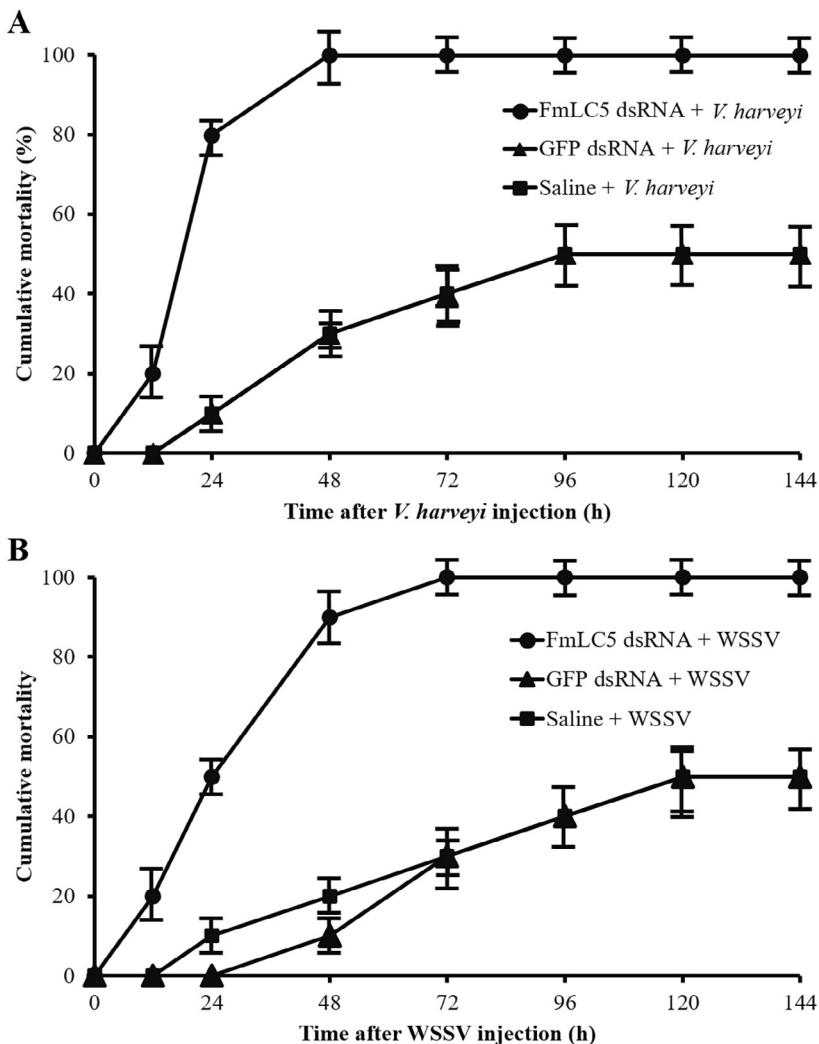


Fig. 6. Cumulative mortality of FmLC5 silenced shrimp injected with *V. harveyi* (A) or WSSV (B). Shrimp were challenged with *V. harveyi* or WSSV following the second injection of dsRNA. Control shrimp were administered with GFP dsRNA or saline. Shrimp mortality was recorded twice everyday for 6 days. Bars represent standard errors of mean values.

and mediate the *in vivo* bacterial clearance (Utarabhand et al., 2017b). Recombinant proteins of FcLec2 and FcLec5 could agglutinate and bind directly to bacteria in the presence of  $Ca^{2+}$ , and also bind to LPS (Zhang et al., 2009; Xu et al., 2010) whereas that of FcLec4 could be able to agglutinate Gram-positive and also Gram-negative bacteria, bind to peptidoglycan and mediate phagocytosis and the clearance of *V. anguillarum* (Wang et al., 2009a, 2009b; Wang et al., 2014). Recombinant hFcLec4 could promote *V. anguillarum* clearance in *M. japonicus* (Wang et al., 2014). PmLec could agglutinate and facilitate hemocyte phagocytosis for clearing Gram-negative bacteria in *P. monodon* (Luo et al., 2006).

In crustaceans, gene knockdown by RNA interference is now accepted as a powerful tool to investigate gene function. The knockdown of hFcLec4 gene using dsRNA discouraged the *V. anguillarum* clearance in *M. japonicus* (Wang et al., 2014). The LvLec1 expression was decreased by 98% by gene silencing and the gene protected *L. vannamei* from WSSV infection (Luo et al., 2011). In this study, RNAi approach was performed to evaluate the function in anti-pathogenic activity of FmLC5 gene which was dominantly expressed in *F. merguensis* hemocytes. The gene silencing by FmLC5 dsRNA prior to either *V. harveyi* or WSSV inoculation revealed that the expression of FmLC5 gene was critically suppressed up to 95%, and thus it affected dramatically the shrimp anti-activity against *V. harveyi* and WSSV. The median lethal time for 50% mortality of dsRNA-*V. harveyi* group (18 h) or dsRNA-WSSV group (1 day) decreased compared to those of controls, 4 days for GFP dsRNA/saline-*V. harveyi* and 5 days for GFP dsRNA/saline-WSSV treatment. Upon silencing shrimp followed by *V. harveyi* or WSSV

injection, the cumulative mortality increased to 100% in day 2 or day 3, respectively, faster than those of controls (50% in day 4–6 with *V. harveyi* co-injection and in day 5–6 with WSSV challenge). The gene silencing experiments confirmed that FmLC5 should participate in protecting the shrimp from *V. harveyi* and WSSV infection with a higher potential towards *V. harveyi* than WSSV. From our results and other reports indicated that FmLC5 might contribute in shrimp defense response against bacterial or viral invaders.

In summary, a new C-type lectin (FmLC5) containing two similar CRDs each of which had one QPD motif and  $Ca^{2+}$  binding site-2 was found in *F. merguensis*. The FmLC5 transcript was detected only in the hemocytes in according well with the localization in semi-granular and granular cells demonstrated by *in situ* hybridization. After challenge with *V. harveyi*, WSSV or LPS, the expression of FmLC5 was significantly up-regulated. RNAi-based silencing with co-injection with *V. harveyi* or WSSV resulted in the dramatical suppression of FmLC5 expression, increasing in mortality and reduction of the median lethal time. These results indicated that FmLC5 found in the hemocytes might function in the immune response to protect the shrimp from bacterial and viral invasion.

#### Acknowledgments

This work was granted by the Thailand Research Fund through the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (Grant No. PHD/0101/2556 to Wilaiwan Senghoi) and Prince of Songkla University through the government budget, the Graduate School and the Academic Strengthening

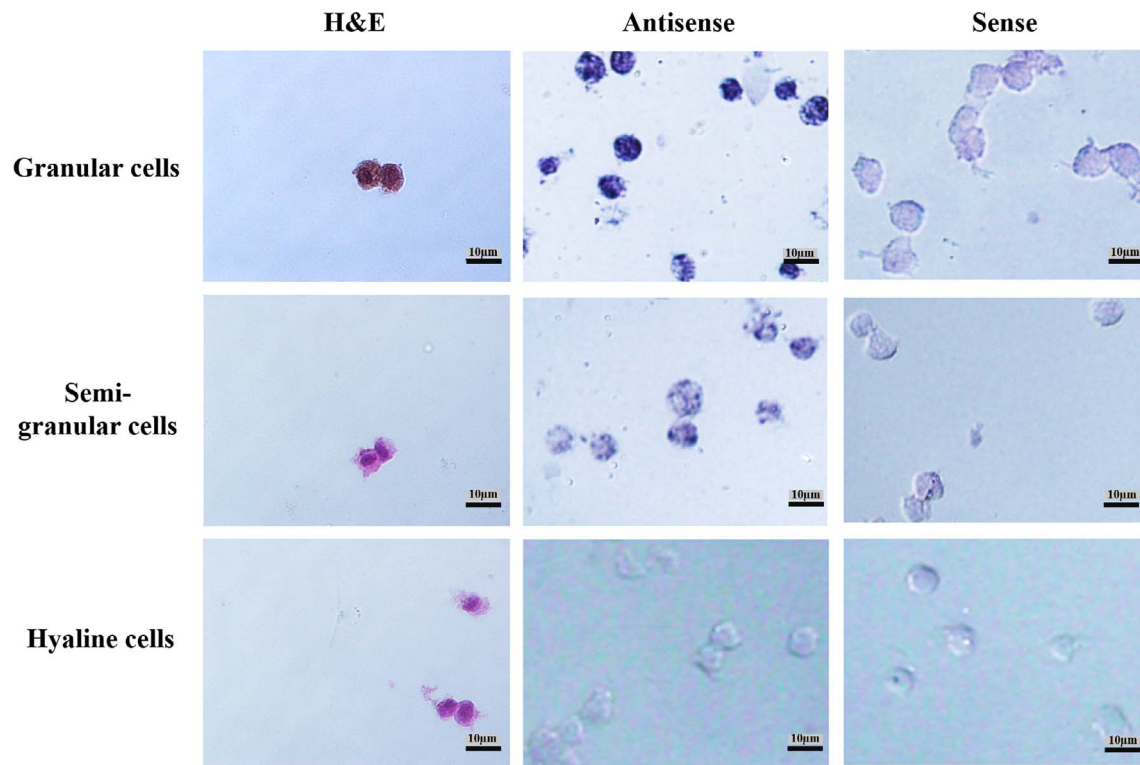


Fig. 7. *In situ* hybridization of FmLC5 mRNA in the *F. merguensis* hemocytes. Antisense, hybridization with antisense probe shows positive signals appeared in granular and semi-granular cells but not in hyaline cells. Sense, hybridization with sense probe shows negative signal in all types of hemocyte cells. H & E, staining with hematoxylin and eosin. Bars = 10 µm.

Program in Biochemistry, Faculty of Science.

#### Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2017.09.013>.

#### References

- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G., Brunak, S., 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340, 783–795.
- Beutler, B., 2004. Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol.* 40, 845–859.
- Drickamer, K., 1992. Engineering galactose-binding activity into a C-type mannose-binding protein. *Nature* 360, 183–186.
- Drickamer, K., 1993. Recognition of complex carbohydrates by Ca<sup>2+</sup>-dependent animal lectins. *Biochem. Soc. Trans.* 21, 456–459.
- Elrod-Erickson, M., Mishra, S., Schneider, D., 2000. Interaction between the cellular and humoral immune responses in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 10, 781–784.
- Gollas-Galván, T., Hernández-López, J., Vargas-Albore, F., 1999. Prophenoloxidase from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) hemocytes. *Comp. Biochem. Physiol.* 122B, 77–82.
- Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A., Ezekowitz, R.A., 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313–1318.
- Janeway Jr., C.A., Medzhitov, R., 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 197–216.
- Jiravanichpaisal, P., Leeb, B.L., Söderhäll, K., 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology* 211, 213–236.
- Junkunlo, K., Prachumwat, A., Tangprasittipap, A., Senapin, S., Bavornphinyo, S., Flegel, T.W., Sritunyaluksana, K., 2012. A novel lectin domain-containing protein (LvCTLD) associated with response of the whiteleg shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* to yellow head virus (YHV). *Dev. Comp. Immunol.* 37, 334–341.
- Kolattar, A.R., Weis, W.I., 1996. Structural basis of galactose recognition by C-type animal lectins. *J. Biol. Chem.* 271, 6679–6685.
- Lavine, M.D., Strand, M.R., 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1295–1309.
- Li, M., Li, C., Ma, C., Li, H., Zuo, H., Weng, S., Chen, X., Zeng, D., He, J., Xu, X., 2014. Identification of a C-type lectin with antiviral and antibacterial activity from Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Dev. Comp. Immunol.* 46, 231–240.
- Liu, Y.C., Li, F.H., Dong, B., Wang, B., Luan, W., Zhang, X.J., Zhang, L.S., Xiang, J.H., 2007. Molecular cloning, characterization and expression analysis of a putative C-type lectin (Fclectin) gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Mol. Immunol.* 44, 598–607.
- Luo, T., Yang, H., Li, F., Zhang, X., Xu, X., 2006. Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* 30, 607–617.
- Luo, Z., Zhang, J., Li, F., Zhang, X., Liu, C., Xiang, J., 2011. Identification of a novel C-type lectin from the shrimp *Litopenaeus vannamei* and its role in defense against pathogens infection. *Chin. J. Ocean Limnol.* 29, 942–951.
- Ma, T.H.T., Benzie, J.A.H., He, J.G., Chan, S.M., 2008. PmLT, a C-type lectin specific to hepatopancreas is involved in the innate defense of the shrimp *Penaeus monodon*. *J. Invertebr. Pathol.* 99, 332–341.
- Ma, T.H.T., Tiu, S.H.K., He, J.G., Chan, S.M., 2007. Molecular cloning of a C-type lectin (LvLT) from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: early gene down-regulation after WSSV infection. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 430–437.
- Phiriyangkul, P., Puengyam, P., Jakobsen, I.B., Utarabhand, P., 2007. Dynamics of vitellogenin mRNA expression during vitellogenesis in the banana shrimp *Penaeus (Fenneropenaeus) merguensis* using real-time PCR. *Mol. Reprod. Dev.* 74, 1198–1207.
- Rattanaoporn, O., Utarabhand, P., 2011. Molecular cloning of a C-type lectin with two CRD domains from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis*: early gene up-regulation after *Vibrio harveyi* infection. *J. Invertebr. Pathol.* 106, 196–204.
- Ren, Q., Li, M., Du, J., Zhang, C.Y., Wang, W., 2012. Immune response of four dual-CRD C-type lectins to microbial challenges in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol.* 33, 155–167.
- Rittidach, W., Pajit, N., Utarabhand, P., 2007. Purification and characterization of a lectin from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis* hemolymph. *Biochim. Biophys. Acta* 1770, 106–114.
- Rowley, A.F., Powell, A., 2007. Invertebrate immune systems-specific, quasi-specific, or nonspecific? *J. Immunol.* 179, 7209–7214.
- Runsaeng, P., Thepnarong, S., Rattanaoporn, O., Utarabhand, P., 2015. Cloning and the mRNA expression of a C-type lectin with one carbohydrate recognition domain from *Fenneropenaeus merguensis* in response to pathogenic inoculation. *Mol. Cell. Probes.* 29, 365–375.
- Smith, V.J., Chisholm, J.R.S., 1992. Non-cellular immunity in crustaceans. *Fish Shellfish Immunol.* 2, 1–31.
- Söderhäll, K., Smith, V.J., 1983. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. *Dev. Comp. Immunol.* 7, 229–239.
- Sun, Y.D., Fu, L.D., Jia, Y.P., Du, X.J., Wang, Q., Wang, Y.H., Zhao, X.F., Yu, X.Q., Wang, J.X., 2008. A hepatopancreas-specific C-type lectin from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* exhibits antimicrobial activity. *Mol. Immunol.* 45, 348–361.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5.2: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.
- Tassanakajon, A., Somboonwivat, K., Supungul, P., Tang, S., 2013. Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 954–967.
- Thepnarong, S., Runsaeng, P., Rattanaoporn, O., Utarabhand, P., 2015. Molecular cloning of a C-type lectin with one CRD from Banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis* and

- its expression upon challenging by pathogenic bacterium or virus. *J. Invertebr. Pathol.* 125, 1–8.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Utarabhand, P., Rittidach, W., Rattanaporn, O., Runsaeng, P., Hedrick, J.L., 2017a. Sialic acid-specific lectin participates in an immune response and ovarian development of the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 203B, 132–140.
- Utarabhand, P., Thepnarong, S., Runsaeng, P., 2017b. Lipopolysaccharide-specific binding C-type lectin with one CRD domain from *Fenneropenaeus merguensis* (FmLC4) functions as a pattern recognition receptor in shrimp innate immunity. *Fish Shellfish Immunol.* 69, 236–246.
- Wang, X.W., Wang, J.X., 2013a. Diversity and multiple functions of lectins in shrimp immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 39, 27–38.
- Wang, X.W., Wang, J.X., 2013b. Pattern recognition receptors acting in innate immune system of shrimp against pathogen infections. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 981–989.
- Wang, L., Wang, L., Zhang, D., Li, F., Wang, M., Huang, M., Zhang, H., Song, L., 2013. A novel C-type lectin from crab *Eriocheir sinensis* functions as pattern recognition receptor enhancing cellular encapsulation. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 832–842.
- Wang, X.W., Xu, J.D., Zhao, X.F., Vasta, G.R., Wang, J.X., 2014. A shrimp C-type lectin inhibits proliferation of the hemolymph microbiota by maintaining the expression of antimicrobial peptides. *J. Biol. Chem.* 289, 11779–11790.
- Wang, X.W., Xu, W.T., Zhang, X.W., Zhao, X.F., Yu, X.Q., Wang, J.X., 2009a. A C-type lectin is involved in the innate immune response of Chinese white shrimp. *Fish Shellfish Immunol.* 27, 556–562.
- Wang, X.W., Zhang, X.W., Xu, W.T., Zhao, X.F., Wang, J.X., 2009b. A novel C-type lectin (FcLec4) facilitates the clearance of *Vibrio anguillarum* *in vivo* in Chinese white shrimp. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 1039–1047.
- Xu, W.T., Wang, X.W., Zhang, X.W., Zhao, X.F., Yu, X.Q., Wang, J.X., 2010. A new C-type lectin (FcLec5) from the Chinese white shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Amino Acids* 39, 1227–1239.
- Yang, J., Wang, L., Zhang, H., Qiu, L., Wang, H., Song, L., 2011. C-type lectin in *Chlamys farreri* (CfLec-1) mediating immune recognition and opsonization. *PLoS ONE* 6, e17089.
- Yu, X.Q., Gan, H., Kanost, M.R., 1999. Immulectin, an inducible C-type lectin from an insect, *Manduca sexta*, stimulates activation of plasma prophenol oxidase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 585–597.
- Zelensky, A.N., Gready, J.E., 2005. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS. J.* 272, 6179–6217.
- 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, Z.Y., Yin, Z.X., Xu, X.P., Weng, S.P., Rao, X.Y., Dai, Z.X., Luo, Y.W., Yang, G., Li, Z.S., Guan, H.J., Li, S.D., Chan, S.M., Yu, X.Q., He, J.G., 2009. A novel C-type lectin from the shrimp *Litopenaeus vannamei* possesses anti-white spot syndrome virus activity. *J. Virol.* 83, 347–356.

## บทที่ 2

### เลคตินที่มีโดเมนไฟบริโนเจน (LFd)

#### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อสร้าง cDNA สายเต็มของยีนเลคตินที่มีโดเมนไฟบริโนเจน (LFd) จากกุ้งแชบ๊วย และศึกษาสมบัติของยีน LFd
2. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน LFd ในเนื้อเยื่อของกุ้งแชบ๊วย
3. เพื่อศึกษาผลการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อก่อโรคกุ้งต่อการแสดงออกของยีน LFd ในกุ้งแชบ๊วย
4. เพื่อสังเคราะห์รีคอมมิแนนท์โปรตีนของเลคติน (Recombinant lectin, rLFd) จากยีน LFd
5. เพื่อทำให้เลคติน rLFd บริสุทธิ์ และศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของเลคติน rLFd บริสุทธิ์

#### วิธีดำเนินการวิจัย

##### 1. กุ้งตัวอย่างและการเตรียมเซลล์ฮีโมไซท์

กุ้งแชบ๊วยที่ใช้ศึกษาเป็นกุ้งมีชีวิต น้ำหนักตัวละประมาณ 25-30 กรัม อยู่ในระยะคราบแข็ง สั่งซื้อจากการจับจากฝั่งทะเลอันดามัน จังหวัดนครศรีธรรมราชหรือจังหวัดใกล้เคียง

ในการเตรียมเซลล์ฮีโมไซท์ ทำโดยดูดฮีโมลิมฟ์จากกุ้งผสมกับสารกันเลือดแข็งตัว [450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM EDTA, 10 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) และ 10 mM HEPES, pH 7.3] (Gollas-Galvin *et al.*, 1999) ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) ที่ความเร็ว 800 x g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนฮีโมไซท์โดยการแขวนลอยใน 10 mM sodium cacodylate, 0.45 M NaCl, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7 แล้วเซนตริฟิวจ์อีกครั้ง ตะกอนที่ได้เก็บไว้ที่ -80 °C เพื่อใช้เตรียม Total RNA หรือนำไปเตรียมสารแขวนลอยฮีโมไซท์ใน modified L15 medium (Liu *et al.*, 2007) เพื่อใช้ในการทดลองข้อ 4.3 ต่อไป

##### 2. การโคลน cDNA ของยีน LFd จากฮีโมไซท์ของกุ้งแชบ๊วยและศึกษาคุณสมบัติ

จากข้อมูล conserved nucleotide sequence ของยีนเลคติน TL-5 ของแมงดาทะเล (*T. tridentatus*) และยีนเลคตินที่มีโดเมนไฟบริโนเจนของครัสเตเชียนชนิดต่าง ๆ ที่หาได้จากฐานข้อมูลใน GenBank นำข้อมูลเหล่านี้ไปออกแบบสร้าง forward และ reverse primer และนำ primer เหล่านี้ไปใช้ในการสร้าง cDNA ของยีน LFd โดยสกัด total RNA จากฮีโมไซท์ของกุ้งแชบ๊วย โดยใช้ชุดเตรียม RNA และทำตามวิธีการของบริษัท ตรวจสอบบริสุทธิ์ของ RNA เทียบกับปริมาณโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร แล้วสร้าง cDNA สายเต็มของยีน LFd จาก total RNA ที่สกัดจากฮีโมไซท์โดยวิธี RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) และวิธี RACE (rapid amplification of cDNA

end) (Utarabhand et al., 2017) แล้วใช้ cDNA synthesis kit ทำการคัดเลือกโคลนที่มียีน LFd ทดสอบขนาดของ cDNA ที่สังเคราะห์ได้โดย restriction enzyme และ agarose gel electrophoresis ทำให้ขึ้น DNA บริสุทธิ์ จากนั้น ligate เข้า vector และ transform เข้า competent cell แล้วส่งหาลำดับเบสของยีน LFd โดยเครื่อง Automate DNA Sequencer นำข้อมูลลำดับเบสของยีน cDNA ที่สร้างได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลของยีนชนิดอื่น ๆ ที่มีอยู่ใน GenBank เพื่อวิเคราะห์ความเหมือนของยีนและยืนยันว่าโคลนได้ยีน cDNA ของยีน LFd จริง รวมทั้งศึกษาสมบัติของยีน LFd สายเต็มเปรียบเทียบกับยีนเลคตินที่มีโดเมนไฟบริโนเจนชนิดอื่น ๆ โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์

### 3. การศึกษาการแสดงออกของ LFd ในเนื้อเยื่อของกุ้งแชบ๊วย

ศึกษาการแสดงออกของยีน LFd ในฮีโมไซท์ ตับ กล้ามเนื้อ และเนื้อเยื่ออื่น ๆ ของกุ้งแชบ๊วย ทำการสร้างโพรบ (probe) ที่มีความจำเพาะของยีน LFd โดยการออกแบบสังเคราะห์ forward และ reverse gene specific primer จากลำดับเบสของยีน LFd แล้วนำ primer เหล่านี้ไปใช้ในการสังเคราะห์ cDNA probe โดยเตรียม RNA ด้วยการสกัด total RNA จากเนื้อเยื่อเหล่านี้ของกุ้ง จากนั้นใช้ RNA และ primer เหล่านี้ติดตามการแสดงออกของ mRNA ของยีน LFd ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ โดยวิธี RT- PCR

### 4. การศึกษาการแสดงออกของยีน LFd ของกุ้งแชบ๊วยที่ฉีดด้วย *V. harveyi* หรือ WSSV

#### 4.1 การเตรียมเชื้อ *V. harveyi* และ WSSV

*V. harveyi* และ WSSV ที่ใช้ศึกษาได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ม.สงขลานครินทร์ โดยเลี้ยง *V. harveyi* บนอาหารแข็ง tryptic soy agar ที่มี 1.5 % NaCl ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18 ชั่วโมง เพิ่มปริมาณเชื้อโดยนำ 1 โคโลนี ไปเลี้ยงในอาหารเหลว (tryptic soy broth) ที่มี 1.5% NaCl ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่ 37 °C จากนั้นเจือจาง 1:100 แล้วนำไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18 ชั่วโมง นำไปเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 1,000 x g นาน 30 นาที ที่ 4 °C ล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียในน้ำเกลือ (0.85% NaCl) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ด้วยการเซนตริฟิวจ์ แขนงลอยตะกอนแบคทีเรียในน้ำเกลือให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (O.D.<sub>600</sub>) อยู่ในช่วง 0.5-0.9 หน่วย นับจำนวนโคโลนีให้อยู่ในช่วงปริมาณเชื้อที่ต้องการ จากนั้นเจือจางเชื้อในน้ำเกลือด้วยอัตราส่วน 1:10 ตามลำดับ ดูดสารแขวนลอยที่ได้อย่างละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปเกลี่ย (spread) บนจานอาหารที่มี plate count agar (PCA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 15 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนเซลล์เพื่อเตรียมความเข้มข้นที่ต้องการฉีดเข้าตัวกุ้งได้

สำหรับ WSSV เตรียมจากการตัดเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อของกุ้งที่เหนียวนำไปตัดเชื้อ WSSV บดให้ละเอียดใน TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.5-0.85% NaCl) ในอัตราส่วน 1: 2 (น้ำหนักเนื้อเยื่อ: ปริมาตร TBS) แล้วเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 12,000 x g นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เก็บส่วนใสที่กรองผ่านกระดาษกรอง (0.45 ไมครอน) ไว้ที่ -80 °C เพื่อใช้ฉีดกุ้งต่อไป

#### 4.2 ศึกษาผลการฉีดกึ่งแซบวัยด้วย *V. harveyi* หรือ WSSV ที่มีต่อการแสดงออกของยีน LFd

เลี้ยงกึ่งแซบวัยในถังพลาสติกกลมความจุ 25 แกลลอน (gallon) โดยเตรียมถังก่อนเลี้ยงกึ่งวัยดังนี้ ล้างถังฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนและทิ้งให้แห้งอย่างน้อย 2 วัน จากนั้นใส่น้ำทะเลที่มีคลอรีนฆ่าเชื้อลงในถังให้อากาศตลอดเวลา ทิ้งไว้ประมาณ 1 อาทิตย์ แล้วนำกึ่งที่คัดขนาดใกล้เคียงกัน ซึ่งมีน้ำหนักประมาณ ตัวละ 25 กรัม ลงเลี้ยงถังละ 5 ตัว โดยให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปทุก 8 ชั่วโมง ปล่อยให้กึ่งปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในถังนาน 1 อาทิตย์ โดยสังเกตว่ากึ่งแข็งแรงไม่มีอาการอ่อนเพลีย วายน้ำและกินอาหารเป็นปกติ จากนั้นนำ *V. harveyi* ที่เลี้ยงใน tryptic soy broth (จากข้อ 14.5.1) ไปเซนตริฟิวส์ ล้างตะกอน ด้วยน้ำเกลือ และเจือจางด้วยน้ำเกลือที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วนำ *V. harveyi* ที่มีความเข้มข้นพอเหมาะต่อการกระตุ้นให้กึ่งติดโรค หรือ WSSV ที่เจือจาง  $10^{-3}$  เท่า ปริมาตรอย่างละ 100 ไมโครลิตร ฉีดกึ่งที่บริเวณกล้ามเนื้อโคนหาง จากนั้นนำกึ่งไปเลี้ยงต่อตามปกติ เมื่อครบเวลาหลังการฉีดนาน 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตัดกระเพาะของกึ่งที่ถูกฉีดด้วยเชื้อหรือกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำเกลือตามเวลาต่าง ๆ เวลาละ 3-5 ตัว (สำหรับกลุ่มที่ 0 ชั่วโมงไม่มีการฉีดเชื้อ) แล้วนำไปสกัด total RNA แล้วติดตามการแสดงออกของ mRNA ของยีน LFd โดยวิธี quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะจาก cDNA ที่สร้างได้จากข้อ 3 ซึ่งติดฉลากด้วย fluorescent dye นำ PCR product ที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณเปรียบเทียบกับ internal standard 18S rRNA แล้ววิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลของกึ่งทั้งสามกลุ่มโดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบปัจจัยเดียว (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95-99%

#### 4.3 ศึกษาผลการบ่มเซลล์ฮีโมไซท์ด้วยไวรัส WSSV ต่อการแสดงออกของยีน LC ในกึ่งขาว

เพื่อศึกษาบทบาทของยีน LC ในเซลล์ฮีโมไซท์ที่ตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำด้วย WSSV ในกึ่งขาว เพื่อเปรียบเทียบบทบาทกับในกึ่งแซบวัย เนื่องจากผลการแสดงออกของยีน LFd พบในเซลล์ฮีโมไซท์น้อยมาก จึงไม่ได้ศึกษายีน LFd ในการทดลองนี้ เพื่อลดความแปรปรวนของกึ่งทดลองแต่ละตัว ทำการทดลองโดยเตรียมเซลล์ฮีโมไซท์จากกึ่งขาวหลายตัว นำมารวมกันเพื่อให้เป็นตัวอย่างเริ่มต้นที่เหมือนกัน แล้วบ่มเซลล์ฮีโมไซท์ของกึ่งขาวด้วย WSSV ( $10^{-3}$  ของ stock) ใน culture plate ที่มี K-199 culture medium ที่อุณหภูมิ 37 °C จากนั้นนำสารแขวนลอยฮีโมไซท์ที่เวลาต่าง ๆ ในช่วง 0-4 ชั่วโมง ไปเซนตริฟิวส์ สกัด total RNA แล้วติดตามการแสดงออกของ mRNA ของยีน LC โดยวิธี semiquantitative RT-PCR เทียบกับเซลล์ฮีโมไซท์ชุดควบคุมที่บ่มกับ K-199 อย่างเดียว โดยใช้โพรบ cDNA ของกึ่งขาวที่สังเคราะห์ขึ้นทำนองเดียวกับของกึ่งแซบวัย และใช้ 18S rRNA ของกึ่งแต่ละชนิดเป็น internal standard

### 5. การผลิตรีคอมมิแนนท์โปรตีน (rLFd) จากยีน LFd และทำบริสุทธิ์

#### 5.1 การผลิตโปรตีนลูกผสมและทำบริสุทธิ์

เพื่อศึกษาบทบาททางชีวภาพของโปรตีนเลคติน LFd โครงการนี้จึงเลือกผลิตโปรตีนลูกผสม (rLFd) ของยีน LFd และศึกษาคุณสมบัติ โดยจากข้อมูลลำดับเบสของยีน LFd สายเต็มที่ได้ ออกแบบและสร้าง primer ที่จำเพาะของ open reading frame (ORF) ของยีน LFd เพื่อสร้าง cDNA สายเต็มของ ORF แล้วโคลน ORF cDNA เข้าใน expression pET32(a+) vector ขนย้าย Recombinant plasmid เข้าสู่ *Esterichia*

*coli* DH5 $\alpha$  จากนั้นเลี้ยงใน Luria-Bertani (LB) broth ที่มี ampicillin ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ C จนมีค่า O.D.<sub>600</sub> ประมาณ 0.5-0.7 หน่วย จากนั้นกระตุ้นการสร้างโปรตีนด้วย IPTG (isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside) เลี้ยงเซลล์ต่อ แล้วทดสอบการสังเคราะห์โปรตีนโดยวิธีโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) จากนั้นเก็บตะกอนเซลล์ด้วยการเซนตริฟิวจ์ สกัดและทำให้ rLFd บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Ni-nitrilotriacetic (Ni-NTA) acid agarose ตามวิธีการของบริษัท Qiagen ทดสอบความบริสุทธิ์และหามวลโมเลกุลของ rLFd บริสุทธิ์ที่เตรียมได้โดยวิธี SDS-PAGE ในสภาวะรีดิวซ์ หาปริมาณโปรตีนตัวอย่างด้วยวิธี Bradford (1976) โดยใช้ BSA (bovine serum albumin) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

## 5.2 การสังเคราะห์แอนติบอดีต่อ rLFd ในกระต่าย

สังเคราะห์แอนติบอดีต่อ rLFd บริสุทธิ์ในกระต่ายขาว ตาแดง ตามวิธีของ Auttarat *et al.* (2006) โดยฉีดกระต่ายด้วย rLFd บริสุทธิ์ สัปดาห์ที่ 1 และ 2 ฉีด rLFd ครั้งละ 20 ไมโครกรัม ผสมกับ Freund's complete adjuvant และอีก 2 สัปดาห์ต่อมาฉีด rLFd 20 ไมโครกรัม ผสมกับ Freund's incomplete adjuvant หลังการฉีดครั้งสุดท้าย 2 สัปดาห์ เจาะเลือดกระต่าย ปล่อยให้เลือดแข็งตัวที่ 4 $^{\circ}$ C นาน 1 คืน หลังการเซนตริฟิวจ์ นำซีรัมไปตกตะกอนด้วยเกลือ ammonium sulphate ที่ความอิ่มตัว 50% จากนั้นแยกแอนติบอดีด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel (Auttarat *et al.*, 2006)

## 6. การทดสอบการเกาะกลุ่มเซลล์ ของ rLFd บริสุทธิ์

### 6.1 การทดสอบการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง (Hemagglutination) ของ rLFd บริสุทธิ์

เพื่อทดสอบสมบัติในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของกระต่ายของ rLFd บริสุทธิ์ ทำดังนี้ เจาะเลือดกระต่ายผสมกับ heparin เพื่อกันเลือดแข็งตัว แล้วล้างเม็ดเลือดแดง 3 ครั้งในบัฟเฟอร์ TBS, pH 7.5 (10 mM Tris-HCl - 0.9% NaCl, pH 7.5) โดยการเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 800 x g ที่ 4 $^{\circ}$ C นานครั้งละ 5 นาที แขนงลอยเม็ดเลือดแดงใน TBS ให้มีความเข้มข้น 2% แล้วนำไปทดสอบการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง โดยผสมสารละลาย rLFd ที่เจือจางแบบ 1:2 ตามลำดับ กับสารแขวนลอยเม็ดเลือดแดง 2% ปริมาตรอย่างละ 50 ไมโครลิตร ในไมโครไตเตอร์เพลท (microtiter plate) ตั้งที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง เปรียบเทียบผลการทดลองกับชุดควบคุมที่ใช้ TBS แทน rLFd แอคติวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง (Hemagglutinating activity, HA) มีค่าเป็นส่วนกลับของไตเตอร์ (titer) ที่เป็นค่าการเจือจางสูงสุดของสารละลาย rLFd ซึ่งยังทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้สมบูรณ์

### 6.2 การทดสอบการเกาะกลุ่มแบคทีเรีย (Bacterial agglutination)

เพื่อทดสอบสมบัติในการเกาะกลุ่มแบคทีเรียก่อโรคและไม่ก่อโรคนิ่งชนิดต่าง ๆ ของ rLFd บริสุทธิ์ ได้แก่แบคทีเรียแกรมลบหรือแกรมบวก ได้แก่ *V. harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus thuringiensis* และ *E. coli* ทำการทดลองตามวิธีของ Utarabhand *et al.* (2007) ดังนี้ เจือจาง rLFd บริสุทธิ์ ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมใน TBS, pH 7.5 จากนั้นใช้ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับสารแขวนลอย

แบคทีเรียแต่ละชนิดปริมาณ 50 ไมโครลิตร ( $5 \times 10^7$  cells/ml) วางที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง พร้อมเขย่าด้วย vortex เบา ๆ 1-2 ครั้ง จากนั้นหยดสารผสมลงบนสไลด์ ปิดด้วย cover slid แล้วสังเกตการเกาะกลุ่มแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ หากค่าไดเตอร์และหาความเข้มข้นโปรตีนน้อยสุดของ rLFd ที่ยังทำให้แบคทีเรียแต่ละชนิดเกาะกลุ่มได้อย่างสมบูรณ์ เพื่อทดสอบผลของ  $Ca^{2+}$  ต่อการเกาะกลุ่มแบคทีเรียของ rLFd ทำการทดลองในทำนองเดียวกัน ในสภาวะที่มีและไม่มี  $Ca^{2+}$

### 6.3 การทดสอบการยับยั้งการเกาะกลุ่มเซลล์ของ rLFd โดยน้ำตาล

ในงานวิจัยนี้จะกำหนดให้ rLFd บริสุทธิ์ที่มีค่าเจือจางสูงสุดที่ยังสามารถเกาะกลุ่มเซลล์ได้สมบูรณ์มีความเข้มข้นเป็น 1X จากนั้นทดสอบความจำเพาะของน้ำตาลต่อ rLFd บริสุทธิ์ ด้วยการทดสอบการยับยั้งการเกาะกลุ่มเซลล์ของ rLFd โดยน้ำตาล ดังนี้ นำสาร ละลาย rLFd บริสุทธิ์ที่เจือจางให้มีความเข้มข้น 4X ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำตาลแต่ละชนิด หรือรวมทั้ง LPS ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร วางที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง แล้วผสมกับสารแขวนลอยเม็ดเลือดแดง 4% ปริมาตร 25 ไมโครลิตร หรือสารแขวนลอยแบคทีเรีย ( $10^8$  cell/ml) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร จากนั้นคำนวณความเข้มข้นของน้ำตาลที่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มเซลล์ของ rLFd ได้ 100% น้ำตาลชนิดที่ยับยั้งการเกาะกลุ่มเซลล์ด้วยความเข้มข้นต่ำสุดจะมีความจำเพาะมากที่สุด ซึ่งนำไปเป็นข้อมูลในการทดสอบข้อ 8 ต่อไป

## 7. การทดสอบการจับ (Binding) ระหว่าง rLFd กับแบคทีเรีย

เพื่อทดสอบการจับของ rLFd บริสุทธิ์ กับแบคทีเรียก่อโรคกึ่งเช่น *V. harveyi* หรือแบคทีเรียไม่ก่อโรคกึ่งเช่น *E. coli* เป็นต้น ทำการทดลองโดยนำ rLFd บริสุทธิ์ไปบ่มกับแบคทีเรียแต่ละชนิดในบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเซนตริฟิวส์ด้วยความเร็ว  $2,200 \times g$  ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}C$  เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิม รวม 4 ครั้ง แล้วชะ rLFd ออกจากตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 6.8 ที่มี 7% SDS จากนั้นนำส่วนใสที่ได้จากการเซนตริฟิวส์ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE และวิเคราะห์ต่อด้วยวิธี Western blot ต่อแอนติบอดีของ rLFd ตามวิธีของ Auttarat *et al.* (2006) ดังนี้ ฆ่าถ่ายโปรตีนในแผ่นเจลไปยังแผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane) ด้วยกระแสไฟตามวิธีของ Towbin *et al.* (1979) ล้างแผ่นเมมเบรน ด้วยบัฟเฟอร์ TBS, pH 7.5 แล้ว block ด้วย BSA ล้างเมมเบรนต่อด้วย TBS ที่มี Tween 20 (TBST) จากนั้นบ่มด้วยแอนติบอดีต่อ rLFd ( $1^{\circ}Ab$ ) ใน TBST-1% BSA ล้างเมมเบรนด้วย TBST แล้วนำไปแช่ในสารละลายแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายซึ่งยึดติดกับแอนิเมปเปอร์ออกซิเดส (anti-rabbit IgG peroxidase conjugate) หรือ  $2^{\circ}Ab$  จากนั้นย้อมเมมเบรนด้วยสารละลายที่มีสับสเตรทของแอนิเมปเปอร์ออกซิเดส (3,3'-diaminobenzidine และ  $H_2O_2$ ) แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยล้างเมมเบรนด้วยน้ำกลั่น เพื่อทดสอบผลความต้องการของ  $Ca^{2+}$  ต่อการจับของ rLFd กับแบคทีเรีย ทำการทดลองในทำนองเดียวกัน ในสภาวะที่มีและไม่มี  $CaCl_2$



## 8. การทดสอบการจับระหว่าง rLFd กับ LPS หรือ LTA

เพื่อทดสอบการจับของ rLFd บริสุทธิ์ กับ LPS หรือ LTA (lipoteichoic acid) ทำตามวิธี Utabhand *et al.* (2017) ดังนี้ เคลือบผิวไมโครไตเตอร์เพลทหรือเพลทด้วยน้ำตาลความเข้มข้นต่าง ๆ ในบัฟเฟอร์ 50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9.6 บ่มที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 12 ชั่วโมง ล้างเพลทด้วยบัฟเฟอร์ PBST (50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4 - 0.05% Tween 20) แล้ว block ด้วย 3% BSA ใน PBST บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างเพลทแล้วบ่มกับ rLFd บริสุทธิ์ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นติดตามปฏิกิริยาด้วย 1<sup>o</sup>Ab และ 2<sup>o</sup>Ab ตามลำดับ แล้ววัดปฏิกิริยาที่เกิดด้วยสับสเตรทของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (o-phenylene diamine diHCl และ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) หยุดปฏิกิริยาด้วย 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร (O.D.<sub>492</sub>) ด้วยเครื่อง ELISA Reader จากค่า O.D.<sub>492</sub> ที่วัดได้ สามารถคำนวณผลของการจับระหว่าง rLFd กับ LPS หรือ LTA ได้

## ผลการวิจัย

ดังได้กล่าวในคำนำแล้วว่าผลงานวิจัยนี้ยังไม่ได้เตรียมต้นฉบับเพื่อตีพิมพ์เผยแพร่ จึงขอไม่เขียนรายละเอียดของผลงานวิจัยและการวิจารณ์ไว้ในรายงานฉบับนี้ แต่รายละเอียดทั้งหมดจะอยู่ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่ที่จะส่งตามมา โดยขอสรุปผลการทดลองอย่างสั้นเป็นดังนี้

1. จากการโคลนยีน LFd จากฮีโมไซท์ของกุ้งแชบ๊วย พบว่า full-length cDNA ของยีน LFd ประกอบด้วย 1,436 คู่เบส ที่มี 1 open reading frame (936 คู่เบส) ซึ่ง encode สายเปปไทด์ยาว 312 amino acid มีมวลโมเลกุล 34.9 kDa ยีน LFd ของกุ้งแชบ๊วยมีความเหมือนกับของ *T. tridentatus* 46%
2. ยีน LFd มีการแสดงออกในหลายเนื้อเยื่อ แต่มากสุดในกระเพาะ พบน้อยมากในฮีโมไซท์ ด้วยเหตุนี้จึงวัดการแสดงออกยีน LFd ในกระเพาะในการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อก่อโรค
3. จากการบ่มฮีโมไซท์ของกุ้งขาวด้วย WSSV แล้ววัดการแสดงออกของ mRNA ของยีน LC ด้วยวิธี semiquantative RT-PCR ในช่วงเวลา 0 - 4 ชั่วโมง พบการแสดงออกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จึงไม่ได้ทำการทดลองในกุ้งขาวต่อ
4. จากการฉีดกุ้งแชบ๊วยด้วย *V. harveyi* และ WSSV พบการแสดงออกของ mRNA ของยีน LFd ในกระเพาะต่อเชื้อก่อโรค โดยถูกกระตุ้นให้เพิ่มขึ้นสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญที่ 12 และ 48 ชั่วโมง หลังการฉีดตามลำดับ
5. งานวิจัยนี้สามารถผลิตและทำบริสุทธิ์โปรตีนลูกผสมของยีน LFd (rLFd) โดยพบว่า rLFd บริสุทธิ์ มีมวลโมเลกุล 50.1 kDa คำนวณมวลของ Hig-tag peptide และทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะต่อ anti-rLFd antibody
6. rLFd บริสุทธิ์ ไม่สามารถกระตุ้น hemagglutination ของเม็ดเลือดกระต่าย แต่กระตุ้นให้แบคทีเรียแกรมลบ (*V. harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, และ *E. coli*) และแกรมบวก (*B. thuringiensis*) เกิด

agglutination ได้โดยต้องการ  $Ca^{2+}$  การเกาะกลุ่มของแบคทีเรีย *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* โดย rLFd ถูกยับยั้งได้โดยน้ำตาล LPS และ LTA

7. rLFd บริสุทธิ์ เกิด direct binding กับแบคทีเรีย *V. harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *E. coli* และ *B. thuringiensis* ได้

8. จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA พบว่า rLFd บริสุทธิ์ จับได้กับ LPS และ LTA ซึ่งเป็น cell component ของแบคทีเรีย

9. งานวิจัยเหล่านี้บ่งชี้ว่าเลคติน LFd เป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกันของ กุ้งแชบ๊วย

### เอกสารอ้างอิง

สุพจน์ จิ่งแย้มปิ่น และชัยรัตน์ พุ่มช่วย. 2543. ผลงานชิ้นโบแดงสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดตรัง เลี้ยงพ่อแม่แชบ๊วยในบ่อดินสำเร็จ. วารสารสัตว์น้ำ 11(132), 37-44.

Auttarat, J., Phiriyangkul, P. and Utarabhand, P. 2006. Characterization of vitellin from the ovaries of the banana shrimp *Litopenaeus merguensis*. Comp. Biochem. Physiol. B 143, 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 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

Chaosomboon, A., Phupet, B., Rattanaporn, O., Runsaeng, P., Utarabhand, P., 2017.

Lipopolysaccharide- and b-1,3-glucan-binding protein from *Fenneropenaeus merguensis* functions as a pattern recognition receptor with a broad specificity for diverse pathogens in the defense against microorganisms. Dev. Comp. Immunol. 67, 434-444.

Gokudan, S., Muta, T., Tsuda, R., Koori, K., Kawahara, T., Seki, N., Mizunoe, Y., Wai, S.N., Iwanaga, S. and Kawabata, S.-I. 1999. Horseshoe crab acetyl group-recognizing lectins involved in innate immunity are structurally related to fibrinogen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96, 10086-10091.

Gollas-Galvin, T., Hernandez-Lopez, J. and Vargas-Albores, F. 1999. Prophenoloxidase from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) hemocytes. Comp. Biochem. Physiol. 122B, 77-82.

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

Liu, Y. C., Li, F. H., Dong, B., Wang, B., Luan, W., Zhang, X. J., Zhang, L. S., Xiang, J. H. 2007. Molecular cloning, characterization and expression analysis of a putative C-type lectin

- (Fclectin) gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. Mol. Immunol. 44, 598-607.
- Medzhitov, R. and Janeway, Jr., C.A. 1997. Innate immunity: the virtues of a non-clonal system of recognition. Cell 91: 295.
- Ratanapo, S. and Chulavatnatol, M. 1992. Monodin-induced agglutination of *V. vulnificus*, A major infective bacterium in black tiger prawn (*Penaeus monodon*). Comp. Biochem. Physiol. 102, 855-859.
- Rittidach, W., Pajit, N. and Utarabhand, P. 2007. Purification and characterization of a lectin from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis* hemolymph. Biochem. Biophys. Acta 1170, 106-114.
- Söderhäll, K. and Cerenius, L. 1998. Role of the prophenoloxidase activating system in invertebrate immunity. Curr. Opin. Immunol. 10, 23-28.
- Thepnarong, S., Runsaeng, P., Rattanaporn, O., Utarabhand, P., 2015. Molecular cloning of a C-type lectin with one CRD from Banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis* and its expression upon challenging by pathogenic bacterium or virus. J. Invertebr. Pathol. 125, 1-8.
- Utarabhand, P., Rittidach, W. and Pajit, N. 2007. Bacterial agglutination by sialic acid-specific lectin in the hemolymph of the banana shrimp, *Penaeus (Fenneropenaeus) merguensis*. Science Asia 33, 41-46.
- Utarabhand, P., Thepnarong, S., Runsaeng, P., 2017. Lipopolysaccharide-specific binding C-type lectin with one CRD domain from *Fenneropenaeus merguensis* (FmLC4) functions as a pattern recognition receptor in shrimp innate immunity. Fish Shellfish Immunol. 69, 236-246.