การโคลนและศึกษาสมบัติของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนจากกุ้งแชบ๊วย

Cloning and Characterization of Fibrinogen–Related Protein Gene from Banana Shrimp (*Fenneropenaeus merguiensis*)

โดย

ดร.อรณิชา รัตนาภรณ์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

โครงการนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัย

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2556 รหัสโครงการ SCI560539S

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	3
สารบัญภาพประกอบ	3
กิตติกรรมประกาศ	4
บทคัดย่อ	5
Abstract	6
บทนำ	7
วัตถุประสงค์	10
การตวจเอกสาร	11
วิธีดำเนินการวิจัย	13
ผลการวิจัยและวิจารณ์	18
สรุปผลการวิจัย	29
เอกสารอ้างอิง	30

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เปอร์เซนต์ความเหมือนของ ORF ของ FReP จากกุ้งแชบ๊วยกับ ORF ของ FReP อื่น ๆ ในกุ้งและสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน	25

สารบัญภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
1	แบบแผนการโคลน DNA ของยีน FReP ของกุ้งแชบ๊วย	19
2	แบบแผน DNA ชิ้นกลาง ใน 1.2% agarose gel electrophoresis	20
3	แบบแผน DNA ใน 1.2% agarose gel electrophoresis ด้านปลาย 5' ของยีน FReP ที่ได้จากการทำ PCR	21
4	แบบแผน DNA ใน 1.2% agarose gel electrophoresis ด้านปลาย 3' ของยีน FReP ที่ได้จากการทำ PCR	22
5	แบบแผน DNA บริเวณ Open reading frame ของยีน FReP ใน 1.2% agarose gel electrophoresis ที่ได้จากการทำ PCR	23
6	การแสดงออกของ mRNA ของยีน FReP ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ด้วยวิธี RT–PCR	26
7	ระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน FReP ในเนื้อเยื่อตับของกุ้งหลังการฉีดด้วยเชื้อ *V. harveyi* ณ ช่วงเวลาต่าง ๆ	28
8	ระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน FReP ในเนื้อเยื่อตับของกุ้งหลังการฉีดด้วยเชื้อ WSSV ณ ช่วงเวลาต่าง ๆ	28

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “การโคลนและศึกษาสมบัติของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนจากกุ้งแชบ๊วย” ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากทุนงบประมาณเงินรายได้ ประเภททุนดรุณาจารย์ ประจำปี 2556 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทารพันธุ์ ที่ปรึกษาโครงการวิจัยที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการวิจัย รวมทั้งให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการ เครื่องมืออุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ตลอดมา และขอขอบคุณศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่อนุเคราะห์เชื้อก่อโรค และขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ได้เอื้อเฟื้อเครื่องมือต่าง ๆ เพื่อทำให้งานวิจัยดำเนินลุล่วงไปด้วยดี ผลงานวิจัยนี้ส่วนหนึ่งได้รับการตีพิมพ์แบบ Proceeding ในที่ประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติแล้วและกำลังอยู่ระหว่างการเตรียมต้นฉบับเพื่อตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ ผลสำเร็จและสิ่งที่เป็นประโยชน์ของงานวิจัยนี้ ขออุทิศแด่สัตว์ทดลองทุกชีวิต

อรณิชา รัตนาภรณ์

บทคัดย่อ

โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจน เป็นกลุ่มของโปรตีนที่มี fibrinogen–related domain ภายในโครงสร้าง พบได้ทั่วไปในสัตว์มีกระดูกสันหลังและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ซึ่งส่วนใหญ่ทำหน้าที่เป็น pattern–recognition proteins เพื่อตอบสนองต่อเชื้อก่อโรคและสิ่งแปลกปลอมของสัตว์ที่มีภูมิคุ้มกันแบบที่มีมาแต่กำเนิด (innate immune responses) งานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำการโคลนและศึกษาคุณลักษณะของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องไฟบริโนเจน (Fibrinogen–related protein, FReP) จากกุ้งแชบ๊วย โดยวิธี RT–PCR (Reverse transcription–polymerase chain reaction) และวิธี RACE (rapid amplification of cDNA ends) ผลการศึกษาสามารถโคลนยีน FReP สายเต็มที่มีความยาว 1,031 คู่เบส ประกอบด้วยส่วนปลาย 5' ที่ไม่แปลรหัส 49 คู่เบส ส่วนปลาย 3' ที่ไม่แปลรหัส 214 คู่เบส และมีส่วนที่แปลรหัสเป็นโปรตีน ขนาด 768 คู่เบส ซึ่งถอดรหัสได้เป็นสายโพลีเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 255 หน่วย ที่ประกอบด้วยส่วน signal peptide จำนวน 22 หน่วย มีมวลโมเลกุล เท่ากับ 29.14 กิโลดาลตัน และมีค่า pI เท่ากับ 5.97 ภายในโครงสร้างของ FReP พบโดเมนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจน 1 โดเมน ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 219 หน่วย มีตำแหน่ง N–linked glycosylation 1 ตำแหน่ง ซึ่งมีกรดอะมิโนเป็น NNS ตำแหน่งที่ 138–140 มีบริเวณจับกับ Ca^{2+} 1 ตำแหน่ง และมีบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโน cysteine 4 ตำแหน่ง เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ FReP พบว่ามีความเหมือนกับเลคติน Tachylectin 5A จากแมงดาทะเลญี่ปุ่น *Tachypleus tridentatus* มากคือ 45% จากการศึกษาการแสดงออกของยีน FReP โดยวิธี RT–PCR (Reverse transcription–PCR) พบการแสดงออกในทุกเนื้อเยื่อ แต่พบการแสดงออกมากที่ตับและกระเพาะอาหาร การศึกษาระดับการแสดงออกของ FReP จากตับของกุ้งแชบ๊วยหลังการฉีดด้วยเชื้อ *Vibrio harveyi* หรือ WSSV ด้วยวิธี quantitative real–time PCR พบว่า ระดับการแสดงออกของ FReP เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดย FReP หลังการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อก่อโรค จากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนจากกุ้งแชบ๊วย อาจจะทำหน้าที่เป็น pattern–recognition proteins ในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง

ABSTRACT

The family of fibrinogen-related proteins is a group of proteins with composing of fibrinogen-related domains. It has been found universally in vertebrates and invertebrates. In invertebrates, most of them act as pattern-recognition proteins in innate immune responses. In the present study, a fibrinogen-related protein gene (FReP) was isolated and characterized from banana shrimp *Fenneropenaeus merguiensis*. The cloning strategy was based on reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE) methods. As a result, the full-length cDNA of FReP gene was 1,031 bp in length with 5' untranslated region of 49 bp and 3' untranslated region of 214 bp. The open reading frame of FReP comprised 768 bp and encoded a protein of 255 amino acids with a signal peptide of 22 amino acid residues. Its calculated molecular mass is 29.14 kDa with an estimated pI of 5.97. FReP contains a 219 amino acid fibrinogen-related domain, a putative N-linked glycosylation site, NNS at positions 138-140, a Ca^{2+} binding site and four conserved cysteines. By BLAST analysis, the amino acid sequence of FReP has the highest homology (45% identity) with Tachylectin 5A from *Tachypleus tridentatus*. The RT-PCR showed that FReP gene was expressed in all detected tissues and mainly found in hepatopancreas and stomach. The temporal expressions of the FReP mRNA in hepatopancreas after *Vibrio harveyi* and WSSV challenging were analyzed by quantitative real-time PCR. The mRNA expression of FReP was significantly up-regulated after *V. harveyi* and WSSV challenging. These results collectively suggested that FReP of banana shrimp may act as pattern-recognition proteins in the immune response of shrimp.