รายงานฉบับสมบูรณ์

การโคลนและศึกษาสมบัติของยีนเลคตินที่มีโดเมน Low-density lipoprotein receptor จากกุ้งแชบ๊วยที่ตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำด้วยไวรัสโรคตัวแดงดวงขาว

Gene cloning and characterization of low-density lipoprotein receptor domain containing lectin from *Fennerpenaeus merguiensis* in response to challenge with white spot syndrome virus

คณะนักวิจัย
รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทารพันธุ์
ดร.พันทิพา รุณแสง

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ประจำปีงบประมาณ 2560-2561 รหัสโครงการ SCI600278S

ชื่อโครงการเดี่ยว

การโคลนและศึกษาสมบัติของยีนเลคตินที่มีโดเมน Low-density lipoprotein receptor จากกุ้งแชบ๊วยที่ตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำด้วยไวรัสโรคตัวแดงดวงขาว

Gene cloning and characterization of low-density lipoprotein receptor domain containing lectin from *Fennerpenaeus merguiensis* in response to challenge with white spot syndrome virus

คณะนักวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทารพันธุ์

ดร.พันทิพา รุณแสง

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “การโคลนและศึกษาสมบัติของยีนเลคตินที่มีโดเมน Low-density lipoprotein receptor จากกุ้งแชบ๊วยที่ตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำด้วยไวรัสโรคตัวแดงดวงขาว” นี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2560-2561 ผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เป็นอย่างสูง ที่ได้อนุญาตให้ใช้สถานที่วางถังน้ำทะเลเพื่อเลี้ยง กุ้งในการทดลอง และขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้เอื้อเฟื้อเครื่องมือต่าง ๆ เพื่อทำให้งานวิจัยดำเนินลุล่วงไปด้วยดี ผลงานวิจัยนี้ได้ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ ในฐานข้อมูล ISI Quartile 1 เรียบร้อยแล้ว งานวิจัยนี้ขออุทิศแด่สัตว์ทดลองทุกชีวิต

ประภาพร อุทารพันธุ์

บทคัดย่อ

เลคตินชนิด C (CTL) หลายชนิดได้มีการศึกษา โดยพบว่ามีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ซึ่งทำหน้าที่เป็น pattern recognition receptor (PRR) ในการศึกษานี้ได้โคลนยีน CTL ชนิดใหม่ที่ประกอบด้วยโดเมน lowdensity lipoprotein receptor (LDLR) จากกุ้งแชบ๊วย ให้ชื่อว่า FmLdlr ยีน FmLdlr สายเต็มประกอบด้วย LDLR 1 โดเมน และอีก 1 โดเมน CRD (carbohydrate recognition domain) ซึ่งมี 1 QAP motif ที่จับจำเพาะต่อกาแลคโตส พบการแสดงออกของยีน FmLdlr เฉพาะในฮีโมไซท์ของกุ้งปกติ การแสดงออกของยีนนี้ถูกกระตุ้นอย่างมากโดยการเหนี่ยวนำด้วย *Vibrio parahaemolyticus* หรือ white spot syndrome virus (WSSV) การ knockdown ยีน FmLdlr ด้วย dsRNA ลดการแสดงออกของยีนอย่างรุนแรง และเมื่อเหนี่ยวนำควบคู่ด้วยเชื้อก่อโรคพบว่ากุ้งตายมากและเร็วขึ้น รวมทั้งพบ WSSV เหลืออยู่ในกุ้งกลุ่มที่ฉีด WSSV

โปรตีนลูกผสมที่ผลิตจาก FmLdlr (rFmLdlr) และสองโดเมน (rCRD และ rLDLR) สามารถทำให้แบคทีเรียหลายชนิดเกาะกลุ่ม โดยพบว่า rLDLR มีแอคทิวิทีต่ำสุด เฉพาะ rFmLdlr และ rCRD ที่สามารถกระตุ้นให้ฮีโมไซท์เกิด phagocytosis และ encapsulation ได้ รวมทั้ง rFmLdlr และ rCRD ยกเว้น rLDLR มี antibacterial activity โดยยับยั้งการเจริญเติบโตของ *V. parahaemolyticus* ที่เลี้ยงใน medium และในการวิเคราะห์แบบ disk diffusion assay ได้ นอกจากนี้เฉพาะ rFmLdlr และ rCRD สามารถจับกับโปรตีนของ WSSV ทั้งส่วนที่เป็น envelope VP28, tegument VP39A และ capsid VP15 โดย FmLdlr มีความจำเพาะในการจับมากกว่า CRD จากผลการวิจัยเหล่านี้ สรุปได้ว่า FmLdlr มีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง ผ่านบทบาทการทำงานหลักของโดเมน CRD ทั้งความสามารถในการเกาะกลุ่มแบคทีเรีย การกระตุ้น phagocytosis, encapsulation, antimicrobial activity และการจับกับโปรตีนของไวรัส เป็นที่น่าสนใจคือ จากการใช้เทคนิค ELISA พบว่าโดเมน LDLR มีความจำเพาะสูงในการจับกับไวเทลโลจีนินมากกว่าเลคตินทั้งโมเลกุลหรือโดเมน CRD บ่งชี้ว่าเลคติน FmLdlr อาจทำหน้าที่เป็นตัวรับในการขนส่งไวเทลโลจีนินผ่านฮีโมลิมฟ์ในระหว่างมีการสังเคราะห์ไวเทลโลจีนินเพื่อการพัฒนาเจริญพันธุ์ของรังไข่ในกุ้ง

Abstract

A diversity of C-type lectins (CTLs) was coming reported and they are known to participate in invertebrate innate immunity by act as pattern recognition receptor (PRR). In the present study, a unique CTL containing lowdensity lipoprotein receptor (LDLR) domain from *Fenneropenaeus merguiensis* (designated as FmLdlr) was cloned. Its sequence contained a single LDLR domain and one carbohydrate recognition domain (CRD) with a QAP motif putative for galactose-specific binding. The expression of FmLdlr was detected only in hemocytes of healthy shrimp. Its expression was significantly up-regulated by *Vibrio parahaemolyticus* or white spot syndrome virus (WSSV) challenge. The knockdown by FmLdlr dsRNA resulted in severe gene down-regulation. The gene silencing with pathogenic co-inoculation led to reduction of the median lethal time and increasing in the cumulative mortality including the remained WSSV in WSSV co-challenge group. Recombinant proteins of FmLdlr and two domains could agglutinate various bacterial strains which LDLR domain revealed the lowest activity. Only FmLdlr and CRD could enhance phagocytosis and encapsulation by hemocytes. Both FmLdlr and CRD except LDLR domain exhibited the antibacterial activity by inhibiting the growth of pathogenic *V. parahaemolyticus* in cultured medium and disk diffusion assay. Only FmLdlr and CRD could bind to WSSV proteins, envelope VP28, tegument VP39A and also capsid VP15, which FmLdlr had the higher binding affinity than that of CRD. Altogether, we concluded that FmLdlr contributed in shrimp immune defense through the main action of CRD in capable of bacterial agglutination, enhancing the phagocytosis and encapsulation, antimicrobial activity and binding to viral proteins. Interestingly, ELISA approach revealed that LDLR domain displayed the highest binding affinity to vitellogenin than whole molecule and CRD. We signified a new function of FmLdlr that it might presumably act as a receptor for vitellogenin transportation in hemolymph during vitellogenesis of shrimp.

บทสรุปผู้บริหาร

บทนำ

กุ้งเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลทำรายได้ให้แก่ประเทศปีละหลายหมื่นล้านบาท (สถิติการประมงแห่งประเทศไทย, 2548) กุ้งเป็นที่นิยมบริโภคทั้งภายในและต่างประเทศ ประเทศไทยได้มีการพัฒนาเทคนิควิธีการเพาะเลี้ยงจนสามารถเลี้ยงกุ้งในระบบหนาแน่นได้ กุ้งที่นิยมเพาะเลี้ยงในประเทศไทยในขณะนี้คือ กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ซึ่งเข้ามาแทนที่กุ้งกุลาดำ (*Penaeus momodon*) ที่มีการติดเชื้อก่อโรคจนทำให้ผลผลิตลดลงอย่างมาก ไม่คุ้มต่อการลงทุน แต่ข้อด้อยของกุ้งขาวคือต้องนำเข้าพ่อแม่พันธุ์จากต่างประเทศ มีขนาดเล็กกว่ากุ้งกุลาดำ แม้โตเร็ว แต่มีราคาถูกกว่าและรสชาติด้อยกว่ากุ้งกุลาดำ จากการที่กุ้งขาวไม่ใช่กุ้งท้องถิ่นของไทย มีโอกาสติดโรคระบาดได้ง่าย ขณะนี้มีรายงานการเกิดโรคระบาดตายด่วน (EMS, early mortality syndrome) ของกุ้งขาวที่เพาะเลี้ยง ซึ่งเกิดจากแบคทีเรียและไวรัสโรคตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus, WSSV) กุ้งแชบ๊วย *(Fenneropenaeus merguiensis*) ซึ่งเป็นกุ้งท้องถิ่นของประเทศไทยอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของอุตสากรรมการเพาะเลี้ยงกุ้ง เนื่องจากมีข้อได้เปรียบเรื่องต้นทุนการผลิตลูกกุ้งเพราะกุ้งแชบ๊วยที่เลี้ยงในบ่อดินสามารถเจริญพันธุ์เพื่อใช้ในการผลิตกุ้งได้ (สุพจน์ จึงแย้มปิ่น และชัยรัตน์ พุ่มช่วย, 2543) กุ้งแชบ๊วยที่เลี้ยงให้ได้ขนาดที่ต้องการมีราคาสูงกว่ากุ้งกุลาดำที่มีขนาดเท่ากัน (เมธี วัฒนสิงห์, 2543) แต่การเลี้ยงกุ้งในระบบหนาแน่นมักส่งผลกระทบทำให้การเจริญเติบโตลดลง เกิดความเครียด อ่อนแอ และสามารถติดโรคได้ง่าย แบคทีเรียสายพันธุ์หลักที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งในประเทศไทยคือ *Vibrio* species โดยเฉพาะเชื้อ *Vibrio harveyi* เมื่อกุ้งได้รับเชื้อนี้จะเกิดเป็นโรคเรืองแสงและตายในที่สุด รวมทั้งยังมีไวรัสที่แพร่ระบาดที่ทำให้กุ้งเกิดโรคอย่างรุนแรงคือ WSSV ปัจจุบันโรคระบาดของกุ้งก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก การศึกษาโปรตีนที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองจากเชื้อก่อโรคกุ้ง จึงมีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงกุ้ง นักวิจัยจึงได้หันมาสนใจศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งมากขึ้นเพื่อใช้เป็นแนวทางในการป้องกันการติดเชื้อก่อโรคต่อไป

กุ้งอยู่ในกลุ่มครัสเตเชียน (crustacean) เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง มีระบบไหลเวียนเลือดที่เรียกว่า ฮีโมลิมฟ์ (hemolymph) เป็นแบบเปิด มีกลไกการป้องกันตนเองที่เรียกว่าระบบภูมิคุ้มกันที่มีแต่กำเนิด (innate immune system) เพื่อป้องกันจุลินทรีย์ (microorganism) ที่บุกรุก กลไกการป้องกันตนเองของครัสเตเชียนรวมทั้งกุ้งอาศัยระบบภูมิคุ้มกันสองแบบ ได้แก่ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (cellular immunity) ซึ่งอาศัยการทำงานของเซลล์ฮีโมไซท์ (hemocyte) ได้แก่กระบวนการกลืนกิน (phagocytosis) การเกิดโนดูล (nudule formation) และการกักล้อม (encapsulation) จุลินทรีย์ที่บุกรุก เป็นต้น ครัสเตเชียนยังมีระบบภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (humoral immunity) ที่ประกอบด้วยโปรตีน

หลายชนิด (Söderhäll and Cerenius, 1998) ในสภาวะปกติจะมีปริมาณน้อยมาก และโปรตีนเหล่านี้จะถูกหลั่งออกมามีปริมาณเพิ่มขึ้นในฮีโมลิมฟ์เมื่ อสัตว์เกิดการติดเชื้อหรือถูกกระตุ้น ระบบภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำถูกกระตุ้นได้โดยโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่เป็นองค์ประกอบบนผิวเซลล์ของจุลินทรีย์ เช่น เบตา-1,3-กลูแคน (β-1,3-glucan), lipopolysaccharide (LPS) หรือ peptidoglycan ดังนั้นโปรตีนที่จดจำคาร์โบไฮเดรทบนผิวเซลล์เหล่านี้ จึงถูกเรียกว่า pattern recognition proteins (PRPs) (Medzhitov and Janeway, 1997) ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวข้องในระบบป้องกันตนเองทั้งในสัตว์มีและไม่มีกระดูกสันหลัง PRPs มีหลายชนิด เช่นระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase) ซึ่งถูกกระตุ้นโดย LPS จากแบคทีเรีย หรือเบตา-1,3-กลูแคนจากแบคทีเรียหรือ fungi การจับระหว่างองค์ประกอบผิวเซลล์เหล่านี้กับ PRPs นำไปสู่การกระตุ้นให้เกิด opsonin หรือการสลายกรานูล (granule) ของเซลล์ฮีโมไซท์ในกุ้งนาง (crayfish) (Barracco *et al*., 1991) ทำให้มีการหลั่งระบบโปรฟีนอลออกซิเดส ซึ่งเปลี่ยนไปเป็นเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase) ที่เป็นเอนไซม์ในวิถีการสังเคราะห์เมลานิน (melanin) ซึ่งไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บุกรุกต่อไป (Söderhäll and Cerenius, 1998)

เลคติน (lectin) เป็นโปรตีน PRP ชนิดหนึ่งที่มีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งและครัสเตเชียน เลคตินเป็นโปรตีนที่จับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรทบนผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ เช่นเบตา-1,3-กลูแคน หรือ LPS ทำให้เซลล์เกิดการเกาะกลุ่ม (agglutination) เพื่อช่วยกำจัดการบุกรุกของจุลินทรีย์ มีรายงานการพบเลคตินในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งหลายชนิด ซึ่งส่วนมากมีความจำเพาะต่อน้ำตาลที่มีหมู่เอ็น-อะซิทิล (N-acetyl group) โดยเฉพาะกรดไซอะลิค (sialic acid) เช่นเลคตินจากซีรัม (serum) ของกุ้งกุลาดำทำให้แบคทีเรียก่อโรคในกุ้งเกาะกลุ่มได้ (Ratanapo and Chulavatnatol, 1992) ผู้วิจัยและคณะพบเลคตินที่จำเพาะต่อกรดไซอะลิค (sialic acid-specific lectin, LSa หรือ FmL) ในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยมีแอคทิวิที (activity) เพิ่มสูงขึ้นตอบสนองต่อการติดเชื้อก่อโรค *V. harveyi* และเลคติน LSa บริสุทธิ์สามารถทำให้แบคทีเรียก่อโรคกุ้งเกิดการเกาะกลุ่ม แต่ไม่มีผลต่อแบคทีเรียไม่ก่อโรคกุ้ง แสดงถึงบทบาทที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันของเลคติน (Rittidach *et al*, 2007) แม้มีการศึกษาในระดับโมเลกุลของโปรตีนเลคติน LSa ของกุ้งหลายชนิด แต่ยังไม่เคยมีรายงานการโคลนยีนเลคติน LSa ได้สำเร็จ รวมทั้งผู้วิจัยเอง ทำให้ไม่มีข้อมูลระดับยีนของเลคติน LSa ในสภาวะปกติพบปริมาณโปรตีนของเลคตินน้อยมากในฮีโมลิมฟ์ของครัสเตเชียนยากต่อการศึกษา การศึกษาระดับยีนทำได้ง่ายกว่าการศึกษาระดับโปรตีนของเลคตินบริสุทธิ์ ปัจจุบันมีรายงานการศึกษายีนเลคตินในกุ้งหลายชนิดส่วนใหญ่เป็นเลคตินแบบ C (C-type lectin) ซึ่งมีตำแหน่งจับกับ Ca^{2+} (Ca^{2+} binding motif) และมีโดเมนที่จดจำคาร์โบไฮเดรท (carbohydrate recognition domain, CRD) ซึ่งมักโคลนได้จากตับ (hepatopancreas) ยีนเลคตินเหล่านี้มีการแสดงออกตอบสนองต่อการติดเชื้อก่อโรคกุ้ง มีเพียงรายงานในกุ้งขาวจีน (*Fenneropenaeus chinensis*) และในกุ้งแชบ๊วยเท่านั้นที่พบยีนเลคตินแบบ C ในเซลล์ฮีโมไซท์ (Liu *et*

al., 2007; Senghoi et al., 2017) เลคตินแบบ C มี CRD 1, 2 หรือมากกว่า 2 โดเมน เช่นยีนเลคตินแบบ C ชื่อ FmLC และ FmLC1 ของกุ้งแชบ๊วย ที่ผู้วิจัยพบว่ามี 2 และ 1 CRD ตามลำดับ (Rattanaporn and Utarabhand, 2011; Thepnarong *et al*., 2015) นอกเหนือจากการมีโดเมน CRD แล้ว เลคตินของครัสเตเชียนยังประกอบด้วยโดเมนต่างกัน ทำให้เลคตินมีชนิดที่แตกต่างกัน เช่น เลคตินที่มีโดเมนไฟบริโนเจน (fibrinogen domain containing lectin) พบในแมงดาทะเล (horseshoe crab *Tachypleus tridentatus*) เรียกว่า TLs-5 ซึ่ง Gokudan และคณะ (1999) ได้ทำให้เลคติน TLs-5 บริสุทธิ์จากฮีโมลิมฟ์ 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) ในปีที่ผ่านมามีรายงานยีนเลคตินอีกชนิดหนึ่งที่มี CRD และ low-density lipoprotein receptor class A domain (LDLR) โดยมีการแสดงออกมากสุดในเซลล์ฮีโมไซท์ และมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการต้านไวรัสก่อโรค WSSV ในกุ้งคุรุมา (Kuruma *Marsupenaeus japonicus*) (Xu *et al*., 2014) ยังไม่มีรายงานการพบเลคตินชนิดนี้ในกุ้งชนิดอื่น ๆ รวมทั้งกุ้งแชบ๊วย เนื่องจาก WSSV ก่อโรคระบาด รุนแรงต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล อาจรวมทั้งกุ้งขาวในโรค EMS โครงการวิจัยนี้จึงสนใจที่จะโคลนยีนเลคตินแบบ C ชนิดนี้ที่มีโดเมน CRD และ low-density lipoprotein receptor class A (LDLR) ในโมเลกุล จากเซลล์ฮีโมไซท์ของกุ้งแชบ๊วย เพื่อศึกษาบทบาทที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของเลคตินชนิดนี้เปรียบเทียบกับยีนเลคตินแบบ C ที่เคยโคลนได้จากตับของกุ้งชนิดเดียวกัน

เนื่องจากผู้วิจัยได้เริ่มศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญพันธุ์ของรังไข่ (ไวเทลโลจีนิน) และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองของกุ้งแชบ๊วยอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ปี พ.ศ. 2541 (ก่อนมีการนำกุ้งขาวเข้ามาเพาะเลี้ยงในประเทศไทย ซึ่งนักวิชาการคาดหวังว่ากุ้งแชบ๊วยอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการเพาะเลี้ยงแทนกุ้งกุลาดำที่มีปัญหาของการเกิดโรคระบาดอย่างมาก เพราะเป็นกุ้งท้องถิ่นของไทย และขณะนี้กุ้งขาวก็เกิดโรคระบาด EMS แล้ว) โดยผู้วิจัยพบความสัมพันธ์ระหว่างเลคตินและไวเทลโลจีนิน (Utarabhand et al., 2017) รวมทั้งได้ศึกษาบทบาทของโปรตีน PRPs ในสารน้ำหลายชนิดที่มีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งแชบ๊วยซึ่งตอบสนองต่อการติดเชื้อก่อโรคกุ้ง อาทิเช่น เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (อยู่ในระหว่างการเขียน manuscript) และได้รับทุนมหาวิทยาลัยแห่งชาติเพื่อศึกษาบทบาทของโปรตีนจับลิโพโพลีแซคคาไรด์และเบตา-1,3-กลูแคน (LGBP) ที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อก่อโรคในกุ้งแชบ๊วย (Chaosomboon et al., 2017) รวมทั้งเลคติน LSa และยีนเลคตินแบบ C เพื่อให้งานวิจัยเกี่ยวกับภูมิคุ้มกันในกุ้งแชบ๊วยครบสมบูรณ์ในกุ้งชนิดเดียวกัน โครงการวิจัยนี้จึงสนใจที่จะใช้กุ้งแชบ๊วยเป็นตัวอย่างในการศึกษา โดยมีจุดประสงค์ที่จะศึกษาโมเลกุลระดับโปรตีนและยีนของเลคตินชนิดที่มีโครงสร้างโดเมนภายในโมเลกุลที่ต่างกันคือโดเมน CRD และ LDLR โดยเรียกชื่อยีนในโครงการนี้ว่ายีน FmLdlr โดยจะโคลนยีนของเลคติน Ldlr ชนิดนี้จากเซลล์ฮีโมไซท์ของกุ้งแชบ๊วย และใช้เทคนิค

ที่มีประสิทธิภาพคือ RNA interference และผลิตโปรตีนลูกผสม (recombinant protein) ของยีนนี้เพื่อศึกษาบทบาทที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองต่อไวรัสก่อ WSSV ผลการวิจัยที่ได้จะนำไปเปรียบเทียบบทบาทที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของเลคตินชนิดที่มีโครงสร้างที่ต่างกัน และเปรียบเทียบบทบาทของเลคตินที่มีแหล่งการแสดงออกที่ต่างกันคือในเซลล์ฮีโมไซท์และในตับหรือในฮีโมลิมฟ์ที่เคยศึกษามาก่อน (Rattanaporn and Utarabhand, 2011; Thepnarong *et al*., 2015; Rittidach *et al*., 2007) รวมทั้งศึกษาการตอบสนองของยีนเลคตินเหล่านี้ต่อการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อก่อโรค WSSV ในกุ้งแชบ๊วย และปฏิสัมพันธ์ของ FmLdlr กับไวเทลโลจีนิน แม้ในปัจจุบันการเพาะเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยเพื่ออุตสาหกรรมยังไม่เป็นที่นิยม แต่องค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษากลไกการป้องกันตนเองในกุ้งแชบ๊วยมาทั้งหมด ก็นำไปใช้กับกุ้งขาวได้ด้วย โดยไม่ทำให้องค์ความรู้ที่ศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งแชบ๊วยที่ได้ทำมาอย่างต่อเนื่องในกุ้งชนิดเดียวกันเสียเปล่า และความรู้ที่ได้จะทำให้เข้าใจบทบาทของเลคตินในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งมากขึ้น ซึ่งจะเป็นข้อมูลวิจัยส่วนหนึ่งนำไปสู่การเรียนรู้กลไกการป้องกันตนเองในกุ้งแบบอาศัยเซลล์ (cellular immunity) ว่ามีความเชื่อมโยงหรือแตกต่างจากภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (humoral immunity) ซึ่งเคยศึกษาบทบาทการทำงานของเลคตินเอนไซม์และโปรตีน PRPs ชนิดอื่นในสารน้ำของกุ้งแชบ๊วยไปแล้ว ทั้งนี้เพราะมักพบว่า โปรตีนต่าง ๆ ในสิ่งมีชีวิตไม่ทำงานเดี่ยว ๆ แต่มีการทำงานร่วมหรือเชื่อมโยงกัน ดังนั้นผลการวิจัยที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้งานวิจัยที่ศึกษาในกุ้งแชบ๊วยกับการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสร้าง cDNA สายเต็มของยีนเลคตินที่มีโดเมน CRD และโดเมน low-density lipoprotein receptor (ยีน FmLdlr) จากกุ้งแชบ๊วย และศึกษาสมบัติของยีน Ldlr
2. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน Ldlr ในเนื้อเยื่อของกุ้งแชบ๊วย
3. เพื่อศึกษาผลการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อก่อโรคกุ้งต่อการแสดงออกของยีน Ldlr ในกุ้งแชบ๊วย
4. เพื่อศึกษาผลของการทำ RNA interference ต่อการแสดงออกของยีน Ldlr ในกุ้งแชบ๊วย
5. เพื่อสังเคราะห์โปรตีนลูกผสมของเลคติน Ldlr (Recombinant lectin, rFmLdlr) จากยีน Ldlr สายเต็ม และจากโดเมน CRD (rCRD) และโดเมน LDLR (rLDLR)
6. เพื่อทำให้โปรตีนลูกผสมบริสุทธิ์ และศึกษาบทบาททางชีวภาพของโปรตีนลูกผสมทั้งสามโดเมน

สรุป

ในการศึกษานี้ ได้โคลนยีนเลคตินแบบ C ชนิดใหม่ที่ประกอบด้วยโดเมน lowdensity lipo-protein receptor (LDLR) จากกุ้งแชบ๊วย ให้ชื่อว่า FmLdlr ซึ่งมีผลสรุปคือ

1. ยีน FmLdlr สายเต็มที่โคลนได้ประกอบด้วย LDLR 1 โดเมน และมี CRD 1 โดเมน ซึ่งมี 1 QAP motif ที่จับจำเพาะต่อกาแลคโตส พบการแสดงออกของยีน FmLdlr เฉพาะในฮีโมไซท์ของกุ้งปกติ การแสดงออกของยีนนี้ถูกกระตุ้นอย่างมากโดยการเหนี่ยวนำด้วย *Vibrio parahaemolyticus* หรือ white spot syndrome virus (WSSV) การ knockdown ยีน FmLdlr ด้วย dsRNA ลดการแสดงออกของยีนอย่างรุนแรง และเมื่อเหนี่ยวนำควบคู่ด้วยเชื้อก่อโรคพบว่ากุ้งตายมากและเร็วขึ้น รวมทั้งพบ WSSV เหลืออยู่ในกุ้งกลุ่มที่ฉีด WSSV

2. โปรตีนลูกผสมที่ผลิตจาก FmLdlr (rFmLdlr) และสองโดเมน (rCRD และ rLDLR) สามารถทำให้แบคทีเรียหลายชนิดเกาะกลุ่ม โดยพบว่า rLDLR มีแอคทิวิทีต่ำสุด เฉพาะ rFmLdlr และ rCRD ที่สามารถกระตุ้นให้ฮีโมไซท์เกิด phagocytosis และ encapsulation ได้ รวมทั้ง rFmLdlr และ rCRD ยกเว้น rLDLR มี antibacterial activity โดยยับยั้งการเจริญเติบโตของ *V. parahaemolyticus* ที่เลี้ยงใน medium และในการวิเคราะห์แบบ disk diffusion assay ได้ นอกจากนี้เฉพาะ rFmLdlr และ rCRD สามารถจับกับโปรตีนของ WSSV ทั้งส่วนที่เป็น envelope VP28, tegument VP39A และ capsid VP15 โดย FmLdlr มีความจำเพาะในการจับมากกว่า CRD จากผลการวิจัยเหล่านี้ สรุปได้ว่า FmLdlr มีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง ผ่านบทบาทการทำงานหลักของโดเมน CRD ทั้งความสามารถในการเกาะกลุ่มแบคทีเรีย การกระตุ้น phagocytosis, encapsulation, antimicrobial activity และการจับกับโปรตีนของไวรัส

3. จากการใช้เทคนิค ELISA เป็นการรายงานครั้งแรกที่พบว่าโดเมน LDLR มีความจำเพาะสูงในการจับกับไวเทลโลจีนินมากกว่าเลคตินทั้งโมเลกุลหรือโดเมน CRD บ่งชี้ว่าเลคติน FmLdlr อาจทำหน้าที่เป็นตัวรับในการขนส่งไวเทลโลจีนินผ่านฮีโมลิมฟ์ในระหว่างมีการสังเคราะห์ไวเทลโลจีนินเพื่อการพัฒนาเจริญพันธุ์ของรังไข่ในกุ้ง

เอกสารอ้างอิง

เมธี วัฒนสิงห์. 2543. การเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยแบบพัฒนา ภูมิปัญญาคนไทย ตลาดในและนอกยังเปิดกว้าง. วารสารสัตว์น้ำ 11(131), 5-16.

สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2548. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ: กรมประมง.

สุพจน์ จึงแย้มปิ่น และชัยรัตน์ พุ่มช่วย. 2543. ผลงานชิ้นโบแดงสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดตรังเลี้ยงพ่อแม่แชบ๊วยในบ่อดินสำเร็จ. วารสารสัตว์น้ำ 11(132), 37-44.

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

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.

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.

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.

Senghoi, W., Runsaeng, P. and Utarabhand, P. 2017. FmLC5, a putative galactose-binding C-type lectin with two QPD motifs from the hemocytes of Fenneropenaeus merguiensis participates in shrimp immune defense. J. Invertebr. Pathol. 150, 136-144.

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

Xu, Y.-H., Bi, W.-J., Wang, X.-W., Zhao, Y.-R., Zhao, X.-F., Wang, J.-X. 2014. Two novel C-type lectins with a low-density lipoprotein receptor class A domain have antiviral function in the shrimp *Marsupenaeus japonicus*. Dev. Comp. Immunol. 42, 323-332.

ภาคผนวก