รายงานวิจัย ฉบับสมบูรณ์

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2550-2551

(รหัสโครงการวิจัย SCI 51005)

****

เรื่อง การโคลนยีนโปรตีนกระตุ้นการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งและคุณลักษณะของโปรตีน

(อังกฤษ): Cloning of Phagocytosis Activating Protein and protein characterization

หน่วยงานที่รับผิดชอบงานวิจัย และ ที่ อยู่ :

หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพโมเลกุลและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

คณะผู้วิจัย และสัดส่วนที่ทำงานวิจัย

1. นางสาว วิไลวรรณ โชติเกียรติ หัวหน้าโครงการ สัดส่วนที่ทำการวิจัย 70%
2. นางสาว ภัศนีย์ เดชะมาก ผู้ร่วมโครงการ สัดส่วนที่ทำการวิจัย 30%

ประเภทของงานวิจัย : การวิจัยพื้นฐาน

สาขาที่ทำการวิจัย : สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช

บทคัดย่อ

ยีนของโปรตีนกระตุ้นเซลล์จับกินสิ่งแปลกปลอม (RPL26) ได้แสดงออกในเลือดของกุ้งกุลาดำเมื่อมีการกระตุ้นด้วยสิ่งแปลกปลอม ในการทดลองนี้ได้ทำการเตรียมโปรตีนลูกผสม GST-RPL26 ในแบคทีเรีย *E. coli* BL21 ได้โปรตีนขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน และโปรตีน GST สำหรับใช้เป็นกลุ่มควบคุม (29 กิโลดาลตัน) โปรตีน GST-RPL26 สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัส WSSV ในกุ้ง โดยมีค่าเปอร์เซนต์การมีชีวิตรอด (relative percent survival, RPS) เป็น 13% 64% และ33% เมื่อได้รับโปรตีนปริมาณ 4 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักตัว 16 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักตัวและ 32 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักตัวตามลำดับ โปรตีนGST-RPL26บริสุทธิ์ สามารถกระตุ้นกระบวนการphagocytosisของเซลล์เม็ดเลือดที่ได้รับการผสมกับโปรตีนปริมาณ 0.01 0.05 และ 0.10 ไมโครกรัม โดยมีค่า phagocytic index และเปอร์เซ็นต์phagocytosis เพิ่มขึ้นตามลำดับและสูงกว่ากลุ่มควบคุมดีที่สุดและที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จะเห็นได้ว่าโปรตีน RPL26 มีคุณสมบัติเป็นโปรตีนกระตุ้นเซลล์จับกินสิ่งแปลกปลอม ช่วยป้องกันการติดเชื้อไวรัส WSSV ซึ่งระดับการแสดงออกของยีน RPL26 ยังสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้การตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งได้อีกด้วย

นอกจากนั้น การทดลองนี้ได้ใช้ยีน PAP เป็นเหยื่อในการค้นหาโปรตีนที่มีปฏิกิริยากับโปรตีน PAP โดยวิธี yeast two-hybrid ซึ่งค้นหาจากกลังยีนของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว และได้พบว่า alpha-2-macroglobulin (α2M) สามารถเกาะเกี่ยวได้กับRPL 26 การทำ GST pull-down ได้แสดงผลเช่นเดียวกันคือ GST-RPL26เกาะเกี่ยวกับα2Mในขณะที่GSTไม่สามารถเกาะได้ จากผลการทดลองสามารถชี้ได้ว่าความสัมพันธ์ระหว่าง RPL26 และ α2M อาจเป็นส่วนหนึ่งของภูมิคุ้มกันเมื่อมีการติดไวรัส WSSV

คำสำคัญของเรื่องที่ทำการวิจัย: Alpha-2-macroglobulin Phagocytosis Activating Protein *Penaeus monodon* Real-time PCR, ribosomal protein L26 white spot syndrome virus yeast two-hybrid

Abstract

The expression level of ribosomal protein L26 gene encoding for phagocytic activating protein (PAP) was detected in hemolymph of immunized-black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). The recombinant proteins of glutathione s-transferase-PAP (GST-RPL26) from *E. coli* BL21 were prepared in this experiment. The GST-RPL26 had a molecular mass of approximately 45 kDa while a glutathione s-trasferase (GST) protein was 29 kDa. The GST protein was used as control groups for all experiments. The relative of percent survival (RPS) of shrimps vaccinated with GST-PAP at 4, 16 and 32 μg/g shrimp were 13%, 64% and 33% respectively after WSSV infection (3 hours post vaccination). Phagocytic index and percentage of phagocytosis were significantly ($p<0.05$) increased with dose dependence when shrimp hemocyte were mixed with purified GST-PAP at 0.01 μg, 0.05 μg and 0.10 μg respectively. The result indicated that vaccination with IVH induced the PAP and facillitated the defense mechanism against WSSV infection. In additions, PAP can act as macrophage activating protein to protect shrimp from WSSV and can used as an indicator of the immune response of the cultured shrimp.

Additonally, a yeast two-hybrid screening of a WSSV-infected *P. monodon* cDNA library performed using PAP gene as bait to test the interaction between PAP and protein in WSSV-infected shrimp. The alpha-2-macroglobulin (α2M) was one of the proteins that interacted with PAP. A GST pull-down assay showed that GST-PAP but not GST alone, was capable of co-precipitating α2M. The results indicated that interaction between PAP and α2M as the part of immune response in the shrimp infected with WSSV.

Keywords: Alpha-2-macroglobulin, Phagocytosis Activating Protein, *Penaeus monodon*, Real-time PCR, ribosomal protein L26, white spot syndrome virus, Yeast two-hybrid.