บทคัดย่อ

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงด้านโครงสร้างและการแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อผิวหนังตลอดวงจรการลอกคราบของกุ้งกุลาดำ

ดร. วราภรณ์ พรหมวิกร

การเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำหลังระยะตัวอ่อนขึ้นอยู่กับการลอกคราบ ปัจจุบันความรู้เกี่ยวกับกลไกการลอกคราบยังไม่กระจ่างชัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งความรู้ที่เกี่ยวกับวงจรการลอกคราบของกุ้งกุลาดำซึ่งเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ดังนั้นการมุ่งทำให้ความรู้เกี่ยวกับกลไกการลอกคราบของกุ้งกุลาดำมีความกระจ่างจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับเนื้อเยื่อผิวหนังของกุ้งกุลาดำในระยะก่อนการลอกคราบ หลังการลอกคราบ และระหว่างวงจรการลอกคราบ ทั้งในด้านโครงสร้างด้วยวิธีการทางเนื้อเยื่อวิทยาและจุลทรรศน์อิเลคตรอนและด้านการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธีการแยกโปรตีนบนแผ่นวุ้นสองมิติ ผลการศึกษาด้านโครงสร้างพบว่าเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังมี 2 ชนิด คือ epidermal cell type I และ epidermal cell type II epidermal cell type I เป็นเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงสัมพันธ์กับวงจรการลอกคราบ โดยที่เซลล์มีการเพิ่มความสูงมากขึ้นตั้งแต่ระยะกลางของช่วงก่อนการลอกคราบไปจนถึงระยะต้นของช่วงหลังการลอกคราบ นอกจากนี้โครงสร้างในไซโตพลาสม วิธีการหลั่งสาร ความกว้างของช่องว่างระหว่างเซลล์ และส่วนยื่นของเซลล์ ก็มีความแตกต่างกันระหว่างระยะก่อนและหลังการลอกคราบ จากการศึกษาการสะสมของคาร์โบไฮเดรทในเนื้อเยื่อของชั้นใต้ผิวหนังพบว่ามีการสะสมของคาร์โบไฮเดรทและโปรตีนเพิ่มมากขึ้นในช่วงเวลาเดียวกันกับที่เซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังมีการเพิ่มความสูงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นมีผลทำให้เกิดการสร้างเปลือกใหม่ทดแทนเปลือกเก่าที่หลุดลอกไป และยังทำให้เปลือกที่สร้างก่อนการลอกคราบและเปลือกที่สร้างหลังการลอกคราบมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน ส่วน epidermal cell type II นั้นยังไม่สามารถยืนยันได้ว่ามีส่วนสัมพันธ์กับการลอกคราบหรือไม่ แต่ก็น่าเชื่อว่าเป็นเซลล์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างและเคลื่อนย้ายคาร์โบไฮเดรทและโปรตีนไปยังเปลือกชั้นนอกสุด ผลการศึกษาด้านการแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อผิวหนังพบว่ามีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของการแสดงออกของโปรตีนหลายชนิดอย่างเห็นได้ชัดในระยะต่างๆ ของวงจรการลอกคราบ จากการคัดเลือกเม็ดโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงสัมพันธ์กับวงจรการลอกคราบไปวิเคราะห์หามวลโมเลกุลและลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของท่อนเปปไทด์ พบว่าเม็ดโปรตีนที่แยกได้บนแผ่นวุ้นสองมิติ ที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 36 กิโลดาลตัน และมีค่าไอโซอิเลคตริกประมาณ 6.5 น่าจะเป็นโปรตีนของกุ้งกุลาดำที่ชื่อว่า allergen Pen m 2 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ในคนที่รับเอาโปรตีนชนิดนี้เข้าไป ส่วนเม็ดโปรตีนอื่นๆ ที่แยกได้ยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันชนิดของโปรตีนต่อไป

คำสำคัญ กุ้งกุลาดำ วงจรการลอกคราบ เนื้อเยื่อผิวหนัง แผ่นวุ้นสองมิติ

Abstract

Characterization of changes in the epidermal structure and protein expression throughout the molting cycle of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*.

Dr. Waraporn Promwikorn

In shrimp, the cycle of post-embryonic growth and development is characterized by a unique molting process. Although it has been studied for over seventy years, the regulatory mechanisms of the molting cycle are not yet fully understood, especially that of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*), which is an important agricultural export product of Thailand. Our aim is to understand the regulatory mechanism of the molting cycle in the black tiger shrimp. In this study we have used histochemical and two dimension gel electrophoresis to investigate changes of structure and protein expression of the epidermal tissues that are related to the premolt, postmolt and intermolt stages of the black tiger shrimp The results show that the epidermis is a single row of cells composed of epidermal type I and type II cells. Changes in the structures of the epidermal type I cells are related to the molting cycle. The epidermal cell height increases during the period of the mid premolt through to the early postmolt stages. The ultra-structures of the premolt and postmolt stages of the cells are also different in several aspects. These include the contents of the cytoplasm, the type of secretory granules, the method of secretion, the width of the intercellular space and cellular protusions. It is also found that the depositions of carbohydrate and protein in the sub-epidermal cells and the size and number of tegumental glands in the sub-epidermal region are also increased in the above period. The results point to the conclusion that all structural changes occur in accord with the rebuilding of new cuticle to replace the old one. Furthermore, the pre-ecdysial and post-ecdysial cuticles have different structures and functions. It is still not clear how the changes in the epidermal type II cells are related to the molting cycle. However, it is possible that this cell is involved in the production and transport of carbohydrate and protein from the epidermis to the most outer layers of the cuticle. When the expression of the epidermal protein is investigated by 2D gels it is found that proteins, expressed during the premolt, postmolt and intermolt stages, are different. The expression of many proteins is up- or down-regulated, during the progress of the molting cycle. Three protein spots showing interesting expression were selected for tryptic digestion, followed with analyses of peptide mass fingerprint and partial amino acid sequence by MALDI-TOF and liquid chromatography mass spectrometers, respectively. One protein spot, with an approximate molecular weight of 36 kD and an isoelectric point of 6.5 on a 2D gel map, may be an allergen Pen m2 protein that has caused allergic reactions in humans. Attempts are now being made to confirm the role of the allergen Pen m2 protein in the molting cycle. The identities of the other two protein spots with approximate molecular weights of 60 and 14 kD, and isoelectric points of 5.0 and 4.2 respectively have not yet been confirmed. The attempt to characterize another protein spot that seems to be involved in the regulatory mechanism is also to be continued.

Key words: *Penaeus monodon,* molting cycle, epidermis, 2D SDS-PAGE