การแสดงออกของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสและยีนต่อการเหนี่ยวนำด้วยการฉีดเชื้อก่อโรคในกุ้ง

Expression of Phenoloxidase and Its gene to Challenging by Pathogenic Injection in Shrimp

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทารพันธุ์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

รายงานฉบับสมบูรณ์
ที่ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณคณะวิทยาศาสตร์
ประจำปี 2554-2555

บทคัดย่อ

เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสซึ่งเป็นรูปแบบที่ active ของโปรฟีนอลออกซิเดส (proPO) เป็นเอนไซม์หลักของครัสเตเซียนรวมทั้งกุ้งที่มีบทบาทสำคัญในการป้องกันตนเองต่อการติดเชื้อก่อโรค ในงานวิจัยนี้พบแอคทิวิทีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (PO) ส่วนมากในพลาสมาของฮีโมลิมฟ์ โดยพบส่วนน้อยในเซลล์ฮีโมไซท์ของกุ้งแชบ๊วย ฮีโมไซยานินเป็นโปรตีนหลักทั้งที่มีอยู่ในฮีโมลิมฟ์หรือที่ทำบริสุทธิ์แล้วไม่มีแอคทิวิทีของเอนไซม์ PO บ่งชี้ว่าเอนไซม์ PO ในฮีโมลิมฟ์ไม่ได้มาจากฮีโมไซยานิน นอกจากนี้ได้ทำให้เอนไซม์ PO บริสุทธิ์จากฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยโดยการทำอัลตราเซนตริฟิวจ์ ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต แยกต่อด้วยคอลัมน์ Q-Sepharose และการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม พบว่าเอนไซม์ PO บริสุทธิ์มีมวลโมเลกุล 630 kDa เมื่อวิเคราะห์โดยโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเทรชัน และมีหน่วยย่อยขนาด 105 kDa ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส เอนไซม์ PO บริสุทธิ์มีจลนศาสตร์แบบไฮเพอร์โบลาและมีค่า K_M และ V_{max} สำหรับ L-DOPA (3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine) เป็น 5 mM และ 0.043 A490/min ตามลำดับ และมีความจำเพาะต่อสับสเตรท dopamine, catechol และ pyrogallol แต่ไม่จำเพาะต่อ tyrosine เอนไซม์ PO บริสุทธิ์ถูกกระตุ้นได้ด้วยเอนไซม์ทริปซิน ลามินาริน ลิโพโพลีแซคคาไรด์และโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต

ได้โคลนยีน proPO จากฮีโมไซท์ของกุ้งแชบ๊วยด้วยวิธี RT-PCR และ 5' และ 3' RACE พบว่า cDNA สายเต็มของยีน proPO ประกอบด้วย 3,245 คู่เบส มี 1 open reading frame ที่ยาว 2,058 คู่เบส ซึ่ง encode สายเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 661 หน่วย โครงสร้างปฐมภูมิของยีน proPO มีตำแหน่งจับ Cu^{2+} 2 ตำแหน่ง ที่ยึดด้วย histidine 6 หน่วย มีหนึ่ง thiol-ester motif มีสอง N-glycosylation site และมีเก้า O-linked glycosylation site จากการ BLAST พบ cDNA ของยีน proPO ของกุ้งแชบ๊วยเหมือนกับของกุ้งขาวจีน *Fenneropenaeus chinensis* มากที่สุด (94%) จากการทำ RT-PCR พบยีน proPO มีการแสดงออกมากสุดในเซลล์ฮีโมไซท์ มีน้อยกว่าในเนื้อเยื่ออื่น ๆ

เพื่อศึกษาการตอบสนองของยีน proPO ต่อการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อก่อโรค ได้ฉีดกุ้งแชบ๊วยด้วย *Vibrio harveyi* พบว่าแอคทิวิทีของเอนไซม์ PO ในฮีโมลิมฟ์เพิ่มขึ้นที่ 6 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับค่าที่ชั่วโมง 0 และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนเพิ่มสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง หลังการฉีด จากนั้นมีค่าลดลง ในทำนองเดียวกันพบการแสดงออกของ proPO mRNA ในฮีโมไซท์เพิ่มขึ้น จนมีค่าสูงสุดที่ชั่วโมง 18 หลังการฉีด ในขณะที่ทั้งแอคทิวิทีของเอนไซม์ PO และการแสดงออกของยีน proPO ของกุ้งชุดควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำเกลือมีค่าไม่เปลี่ยนแปลงที่เวลาต่าง ๆ นอกจากนี้ แอคทิวิทีของเอนไซม์ PO ในฮีโมลิมฟ์และการแสดงออกของยีน proPO ของกุ้งแชบ๊วยที่ฉีดด้วย white spot syndrome virus (WSSV) ก็มีรูปแบบคล้ายการฉีด *V. harveyi* กล่าวคือค่าทั้งสองเพิ่มขึ้นและมีค่าสูงสุดที่ชั่วโมง 12 หลังการฉีด จากนั้นมีค่าลดลง ซึ่งเป็นทำนองเดียวกับกุ้งขาวที่ถูกฉีดด้วย WSSV พบการแสดงออกของยีน proPO เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนเพิ่มสูงสุด ที่ 18 ชั่วโมง หลังการฉีด จากนั้นลดลง ผลการทดลองเหล่านี้บ่งชี้ว่าโปรฟีนอลออกซิเดสถูกกระตุ้นได้และอาจเกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งตอบสนองต่อการติดเชื้อก่อโรคแบคทีเรียหรือไวรัส

Abstract

Phenoloxidase, an active form of prophenoloxidase (proPO), is a key enzyme of crustaceans including shrimps that plays important role in defense mechanism against pathogenic infection. In this study, majority of phenoloxidase activity was detected in the plasma fraction of hemolymph whereas minority was found in the hemocytes of banana shrimp *Fenneropenaeus merguiensis*. Hemocyanin that was found mainly in the hemolymph or purified form, possessed no phenoloxidase activity. These results suggest that phenoloxidase present in the hemolymph is not derived from hemocyanin. Otherwise, phenoloxidase from the hemolymph of banana shrimps was successfully purified by ultracentrifugation, ammonium sulphate precipitation, chromatography on Q-Sepharose column, and subsequently by preparative polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Purified enzyme had a molecular mass of 630 kDa determined by gel filtration chromatography and 105 kDa analyzed by SDS-PAGE. It had hyperbolic kinetics with K_M and V_{max} for L-DOPA (3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine) values of 5 mM and 0.043 A490/min, respectively. It also showed substrate specificity to dopamine, catechol and pyrogallol but not tyrosine. Purified enzyme could be activated by trypsin, laminarin, lipopolysaccharide and SDS.

Prophenoloxidase (proPO) gene was cloned from the hemocytes of *F. merguiensis* by means of reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and 5' and 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE). The full-length cDNA of proPO gene consists of 3,245 bp with one 2,058 bp open reading frame, encoding 661 amino acids. Its deduced amino acid sequence contains two Cu^{2+} binding sites stabilized by six histidine residues, one thiol-ester motif, two N-glycosylation sites and nine O-linked glycosylation sites. By BLAST analysis, *F. merguiensis* proPO cDNA showed closely identity to that of *Fenneropenaeus chinensis* (94%). RT-PCR analysis revealed that proPO transcript was expressed mainly in hemocytes and less in other tissues.

To study the responses of proPO gene to pathogenic challenge, *F. merguiensis* shrimps were injected with *Vibro harveyi* or white spot syndrome virus (WSSV). After challenging by *V. harveyi* injection, phenoloxidase activities in the hemolymph were continuously increased from hour 0 to hour 6 and reached the highest at hour 24 of post-injection and then declined. In similar pattern, the mRNA expression of proPO gene in the

hemocytes increased and reached the maximum at 18 h post-injection. In contrast, no significant differences of either phenoloxidase activities or proPO mRNA expression were detected in the controls which were injected with 0.85% NaCl in parallel. Moreover, the similar patterns of phenoloxidase activities in the hemolymph and proPO mRNA expression in the hemocytes were detected in shrimps injected with WSSV. They were increased from hour 0 to hour 6 and reached the highest at hour 12 of post-injection and subsequently decreased. In similarly, the expression of proPO gene was up-regulated after *Litopenaeus vannamei* was injected by WSSV. Its mRNA expression was continuously increased from hour 0 to hour 6 and reached the peak at hour 18 of post-challenge. These results indicate that proPO is inducible and may be involved in a shrimp immune response to pathogenic bacteria or virus.