ชื่อวิทยานิพนธ์	การโคลนและศึกษาสมบัติของ cDNA ของไวเทลลินในกุ้งแชบ๊วย
ผู้เขียน	นางสาวพริมา พิริยางกูร
สาขาวิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2549

บทคัดย่อ

ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่วางไข่นอกตัวไวเทลลิน (Vitellin, Vt) เป็นองค์ประกอบของโปรตีนโยล์คที่สำคัญซึ่งมีไวเทลโลจีนิน (Vitellogenin, Vg) เป็นโปรตีนตั้งต้น โปรตีนโยล์คในไข่ไม่ได้ประกอบด้วยโปรตีนเท่านั้นแต่ยังประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต ไขมัน แร่ธาตุและวิตามินซึ่งเป็นแหล่งอาหารเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตของเอมบริโอและตัวอ่อน ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำให้ไวเทลลินบริสุทธิ์จากรังไข่ของแม่กุ้งแชบ๊วยโดยการแยกผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephacel และตามด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200 ได้ศึกษาองค์ประกอบกรดอะมิโนของ ไวเทลลินบริสุทธิ์และมีค่า isoelectric point เป็น 5.3 ซึ่งทั้งสองค่านี้คล้ายคลึงกับของไวเทลลินในกุ้งชนิดอื่น ๆ ไวเทลลินมีมวลโมเลกุล 398 กิโลดาลตันจากการทำ 4-10% โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ ภายใต้สภาวะการแปลงสภาพเมื่อวิเคราะห์ด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS-PAGE) ไวเทลลินประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยหลักที่มีขนาด 78 และ 87 กิโลดาลตันและมีบางแถบโปรตีนจางอยู่ด้วย ลำดับของกรดอะมิโน 9 หน่วยทางด้านปลายอะมิโนของหน่วยย่อย 78 และ 87 มีความเหมือนกันซึ่งบ่งบอกว่าโปรตีนของทั้งสองหน่วยย่อยถูกดัดแปลงหลังจากถูกสังเคราะห์ จากการศึกษาลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลายอะมิโนของหน่วยย่อยที่มีขนาด 104 กิโลดาลตันของไวเทลลินบริสุทธิ์แสดงให้เห็นว่าสายโปรตีนของ ไวเทลลินในกุ้งแชบ๊วยถูกตัดที่ส่วนกรดอะมิโนอนุรักษ์ (RTRR) โดยเอนไซม์ subtilisin

ได้ทำการโคลน cDNA ของไวเทลโลจีนิน (Vg cDNA) ในกุ้งแชบ๊วยโดยอาศัยข้อมูลจากลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลายอะมิโนของหน่วยย่อยหลัก 78 และ 87 กิโลดาลตันและส่วนอนุรักษ์ของไวเทลโลจีนิน/ไวเทลลินจากครัสตาเชียน (crustacean) ชนิดอื่น ๆ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ Vg cDNA ได้จากการศึกษาโดยวิธี walking RT-PCR และ RACE (rapid amplification of cDNA ends) ได้เพิ่มปริมาณและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น open reading frame (ส่วนที่สังเคราะห์โปรตีน) จากรังไข่เพื่อยืนยันลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Vg cDNA พบว่ามีความเหมือนกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Vg cDNA ที่ได้จากการทำ walking RT-PCR และ RACE 99% ลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ Vg cDNA ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 7,961 ตัว open reading frame

ประกอบด้วนส่วนที่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโน 2,586 ตัว มีลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ที่สามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ subtilisin 7 ตำแหน่ง (R-X-[K/R]-R หรือ R-X-X-R) เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบกรดอะมิโนของไวเทลลินที่ได้จากการแปลงรหัสมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ (deduced amino acid sequence) พบว่ามีความใกล้เคียงกันมากเมื่อเทียบกับของไวเทลลินบริสุทธิ์

การเปรียบเทียบโครงสร้างปฐมภูมิบ่งบอกว่าส่วนปลายอนุรักษ์ลิโพโปรตีน (lipoprotein terminal domain) อยู่ทางด้านปลายเอ็นของลำดับกรดอะมิโนไวเทลโลจีนินของกุ้งแชบ๊วยซึ่งเป็นสมาชิกของโปรตีนกลุ่มใหญ่ที่ทำหน้าที่ขนส่งไขมันและมีขนาดใหญ่ (large lipid transfer protein) ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลงรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในกุ้งแชบ๊วยคล้ายคลึงมากกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวเทลโลจีนินในครัสเตเชียน (crustacean) อื่น ๆ 10 ชนิดที่มีการรายงานไว้ ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ไวเทลโลจีนินทั้งสายพบว่ามีการแบ่งกลุ่มเหมือนกับการจัดแบ่งสิ่งมีชีวิตออกเป็นกลุ่ม ๆ (taxonomy) ในปัจจุบัน ลำดับกรดอะมิโนของไวเทลโลจีนินของกุ้งแชบ๊วยเหมือนกับของกุ้ง *Penaeus semisulcatus* *มากที่สุด* (91.4%) *และมีความใกล้เคียงกับไวเทลโลจีนินในกุ้งชนิดอื่น ๆ ในช่วง* 86.9-50.3% *มากกว่าในปูที่มีค่าความเหมือนน้อยกว่า* 35% *การคาดคะแนโครงสร้างตติยภูมิจากกรดอะมิโนตำแหน่ง* 42 *ถึงประมาณ* 938 *ทางด้านปลายเอ็นของไวเทลโลจีนินในกุ้งแชบ๊วยโดยใช้โครงสร้างของลิโพไวเทลลิน* (lipovitellin) *จากปลา* lamprey *เป็นต้นแบบพบว่าโครงสร้างแผ่นเอ็น* (N-sheet) *และส่วนเกลียว* (helical domain) มีโครงสร้างที่อนุรักษ์กว่าแผ่นซีและเอ (C- and A-sheet) *ซึ่งสามารถบ่งบอกได้ว่าแผ่นเอ็นและส่วนเกลียวมีปฏิสัมพันธ์ที่สำคัญระหว่างโปรตีนกับโปรตีนดังนั้นโครงสร้างทั้งสองส่วนนี้จึงอนุรักษ์ให้มีโครงร่างเดิม*

ได้ศึกษาแหล่งสังเคราะห์ไวเทลโลจีนินในกุ้งแชบ๊วยโดยใช้เทคนิค RT-PCR ซึ่งพบ Vg mRNA ในรังไข่และตับของกุ้งตัวเมียในระยะที่มีการสร้างไวเทลโลจีนิน แต่ไม่พบ Vg mRNA ในเนื้อเยื่ออื่น ๆ ได้แก่ กล้ามเนื้อ หัวใจและลำไส้ในกุ้งตัวเมียหรือในตับของกุ้งตัวผู้ที่เจริญพันธุ์ จากผลการทดลองทำให้ทราบว่ายีนไวเทลโลจีนินมีการแสดงออกเฉพาะในรังไข่และตับของกุ้งแชบ๊วยตัวเมียที่เจริญพันธุ์

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงการแสดงออก Vg mRNA ในกุ้งแชบ๊วยที่มีพัฒนาการของรังไข่ระยะต่าง ๆ โดยใช้วิธี Taqman real-time PCR พบว่ามีการแสดงออกของ Vg mRNA ในตับเพียงเล็กน้อยและแสดงออกมากที่สุดที่ระยะ 3 ของการพัฒนารังไข่ ในขณะที่ภายในรังไข่มีการแสดงออกของ Vg mRNA มากที่สุดที่ระยะ 2 ของการพัฒนารังไข่ จึงสรุปได้ว่ารังไข่เป็นแหล่งหลักและตับเป็นแหล่งรองในการสร้างไวเทลโลจีนินในกุ้งแชบ๊วย การทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการสร้างไวเทลโลจีนินมีความสัมพันธ์กับการพัฒนารังไข่ การแสดงออกของยีนไวเทลโลจี

นินในตับและรังไข่อาจมีการควบคุมที่แตกต่างกันในแต่ละเนื้อเยื่อ ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 3' ของไวเทลโลจีนินที่เตรียมจากรังไข่และตับ รวมทั้งผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของกรดอะมิโนและนิวคลีโอไทด์บ่งบอกว่า Vg cDNA ในแต่ละเนื้อเยื่อของกุ้งแชบ๊วยน่าจะมีการแสดงออกของยีนไวเทลโลจีนินที่ต่างกันโดยโอกาสความผิดพลาดพบเพียง 1 ใน 1000 เท่านั้น

ได้ศึกษาการเปลี่ยนแผนที่โปรตีโอมิค (proteomic map) ของโปรตีนในรังไข่กุ้งแชบ๊วยที่มีการพัฒนาของรังไข่ซึ่งมีค่า GSI แตกต่างกันด้วยเทคนิคการแยกโดยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบสองมิติ (2-dimensional gel electrophoresis) ในช่วง pH 3-10 และวิเคราะห์โปรตีน 81 จุดโดย LC/MS/MS โดยเน้นโปรตีนที่มีสมบัติชักนำหรือควบคุมโมเลกุลอื่น (chaperone) ซึ่งได้แก่ โปรตีนที่สามารถทนความร้อนได้ (heat shock protein) calreticulin ส่วนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างไข่ (oogenesis) ได้แก่ โปรตีน vasa ME31B mio และ swallow โปรตีนโครงสร้างซึ่งทำหน้าที่ในการรักษารูปร่างของเซลล์และขนส่งโมเลกุลจำเพาะภายในเซลล์ โปรตีนที่ควบคุมการปล่อยสารสื่อประสาท (neurotransmitter) ซึ่งมีผลต่อการพัฒนารังไข่จากฮอร์โมนที่อยู่ในกลุ่มสารสื่อประสาท (neurohormone) คือโปรตีน Ras related protein Rab 3 นอกจากนี้ยังพบผลผลิตของยีนไวเทลโลจีนิน โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการพัฒนารังไข่โดยฮอร์โมนได้แก่ Ras related protein Rab 3 และ calreticulin ผลการทดลองที่ได้อาจช่วยทำให้เข้าใจกระบวนการพัฒนาของรังไข่ได้ดีขึ้น จากผลการทดลองทั้งหมดอาจจะมีประโยชน์สำหรับเการเพาะเลี้ยงกุ้งต่อไปในอนาคต เช่น การใช้ฮอร์โมนในการชักนำให้เกิดการเจริญพันธุ์ของกุ้ง

Thesis Title	Molecular Cloning and Characterization of Vitellin cDNA in the Banana Shrimp, *Penaeus* (*Fenneropenaeus*) *merguiensis*
Author	Miss Pharima Phiriyangkul
Major Program	Biochemistry
Academic Year	2006

Abstract

In oviparous invertebrates, the major yolk protein is vitellin (Vt), to which precursor is referred as vitellogenin (Vg). Egg yolk, containing not only protein but also carbohydrates, lipids, minerals and vitamins, is consumed as a source of nutrients during embryonic and larval development. In this study, Vt was purified from ovary of mature female banana shrimps, *Penaeus* (*Fenneropenaeus*) *merguiensis* by DEAE-Sephacel and Superdex G-200 columns, respectively. Amino acid composition of purified Vt was determined and the isoelectric point is 5.3, both values correspond well with other shrimps. Native Vt had an apparent molecular weight of 398 kDa as determined by 4-10% nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Under denaturing conditions of sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), Vt is composed of two major subunits of 78 and 87 kDa, although some faint bands were also detected. The 9 residues of N-terminal amino acid sequences of the 78 and 87 kDa subunits are identical, indicating that they have post-translation modification. The N-terminus of the 104 kDa subunit of purified Vt was also charecterized and shown that the conserved cleavage site (RTRR) for subtilisin endoprotease is used in *Penaeus merguiensis* Vt processing.

P. merguiensis Vg cDNA was cloned based on the N-terminal amino acid sequence of the major 78 and 87 kDa subunits of purified Vt and conserved sequences of Vg/Vt from other crustacean species. The complete nucleotide sequence of Vg cDNA was achieved by RT-PCR and 5' and 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE). In order to confirm Vg cDNA sequence had been which derived from overlapping regions using a walking RT-PCR and RACE approach, a large open reading frame of Vg cDNA was amplified and sequenced from ovary and it showed 99% identity. The full-length Vg cDNA consists of 7,961 nucleotides. The open reading

frame of this cDNA encodes a precursor peptide, comprised of 2,586 amino acid residues, with seven possible processing sites, R-X-K/R-R or R-X-X-R, recognized by subtilisin-like endoproteases. The amino acid sequence was deduced from the Vg cDNA and its amino acid composition showed a high similarity to that of purified Vt.

The comparison of primary structures reveals that the conserved lipoprotein N-terminal domain located at the N-terminal region of Vg in banana shrimp is a member of a large superfamily: large lipid transfer proteins. The entire deduced amino acid sequences of *P. merguiensis* Vg was very similar to the Vg sequences reported in other 10 decapod crustacean species. The results from phylogenetic analysis of full-length Vg reflect the current taxomic classification of crustaceans. The deduced amino acid sequence of *P. merguiensis* Vg is highly similar (91.4%) to the Vg of *Penaeus semisulcatus* and was more closely related to the Vg sequences from other shrimps (86.9-50.3%) than to those from crabs (less than 35.0% similarity). Tertiary structure prediction from amino acid residue 42 to around 938 of the N-terminal region of *P. merguiensis* Vg by using lamprey lipovitellin as a template showed that the structure of the so-called N-sheet and helical domain are more conserved than C- and A-sheets. This suggests that the N-sheet and the helical domain are important for protein-protein interaction, therefore these domains are conserved and their folding structure is maintained.

Sites of Vg synthesis in banana shrimp were determined by RT-PCR. Vg mRNA was present in both ovary and hepatopancreas of the vitellogenic female shrimps while it was not detected in other tissues including muscle, heart and intestine of females or in hepatopancreas of the mature males. These results indicate that the Vg gene is expressed only in the ovary and the hepatopancreas of mature *P. merguiensis* females.

The dynamics expression of Vg mRNA of *P. merguiensis* during ovarian maturation were examined using a Taqman real-time PCR. Vg mRNA expression is negligible in the hepatopancreas but has the highest expression level at stage 3 of ovarian maturation, whereas in ovary, the highest relative value of Vg mRNA is found in stage 2. Thus, the ovary is conclusively a major site and hepatopancreas is a minor site of the vitellogenin synthesis. This study has shown that Vg synthesis is correlated to ovarian maturation. The expression of Vg gene in these tissues are suspectedly regulated in a tissue specific manner. The result from comparison of partial Vg sequences at the 3' end region from the hepatopancreas and ovary, and the results

from nucleotide-amino acid differences analysis revealed that Vg cDNAs in each tissue of banana shrimp probably ($P < 0.001$) are expressed from different Vg gene.

Changes in the proteomic map of the ovarian proteins from *P. merguiensis* during the process of ovarian development (different GSI (gonadosomatic index) values) were investigated by high-resolution, two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) in the pH range of 3 to 10. A total of 81 spots were identified by LC/MS/MS. Among these proteins are noted as proteins with molecular chaperone properties (heat shock proteins and calreticulin), proteins that involved in oogenesis (vasa, ME31B, mio and swallow protein), and cytoskeleton proteins which play role in maintaining cell shape and specific intracellular transport. Rab 3, a ras related protein, which regulates neurotransmitter release was found and has function as controlling ovarian maturation via neurohormones. Vg gene product was also detected. Proteins involved in regulation of ovarian maturation by hormones are Rab3 and calreticulin. This result might be facilitated a better understanding of the mechanism of ovarian development. Over all these results may be useful for aquaculture in the future such as using hormones to induced maturation of shrimp.